

**Mikrostrukturelle Analyse  
des anterioren Cingulum-Bündels  
mittels Polarized Light Imaging (PLI)**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Friederike Gecks  
geboren am 30.10.1985  
in Weimar

**Gutachter:**

- 1 Prof. Dr. Hubertus Axer, Jena
- 2 Prof. Dr. Ralf Schlösser, Jena
- 3 Prof. Dr. Volker Coenen, Bonn

**Tag der öffentlichen Verteidigung:**

05. Februar 2013

*Für meine Eltern.*

## Abkürzungsverzeichnis

µm	Mikrometer
3D	dreidimensional
5-HT-Rezeptor	Serotoninrezeptor
A.	Area
ACC	anteriöer cingulärer Kortex
AMPA	α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
BA	Brodmann-Areal
cm	Zentimeter
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
CS	Sulcus cinguli
CT	Computertomografie
D(1)-Rezeptor	Dopaminrezeptor Typ1
DSI	Diffusion Spectrum Imaging
DTI	Diffusion Tensor Imaging
FA	fraktionierte Anisotropie
FOM	Faserorientierungskarten
fMRT	funktionelle Magnetresonanztomografie
GABA	γ-Amino-Buttersäure
Hz	Hertz
M-Rezeptor	muscarinerger Rezeptor
MCB	midcinguläres Bündel
MCC	midcingulärer Kortex
ml	Milliliter
mm	Millimeter

mM	millimolar
mm <sup>3</sup>	Kubikmillimeter
MR	Magnetresonanz
MRT	Magnetresonanztomografie
nm	Nanometer
NRG1	Neuregulin 1
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PC	Personal Computer
PCC	posteriorer cingulärer Kortex
PCS	posteriorer cingulärer Sulcus
PET	Positronen–Emissions–Tomografie
PLI	Polarized Light Imaging
RGB	rot–grün–blau
RSC	retrosplenischer Kortex
ROI	Region besonderen Interesses
RWTH	Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule
THz	Terahertz
vgl.	vergleiche
VOI	Volumen besonderen Interesses

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	1
Inhaltsverzeichnis .....	3
1 Zusammenfassung .....	5
2 Einleitung .....	7
2.1 Gyrus cinguli .....	7
2.1.1 Neuroanatomische Struktur .....	7
2.1.2 Limbisches System und Gyrus cinguli .....	12
2.1.3 Funktion und Bedeutung des Gyrus cinguli .....	14
2.1.4 Klinische Bedeutung des anterioren Cingulum.....	16
2.2 Möglichkeiten zur Darstellung der Faseranatomie .....	20
3 Ziele der Arbeit .....	25
4 Material und Methoden .....	27
4.1 Präparation und Erstellung der Dünnschnittpräparate .....	27
4.2 Polarized Light Imaging (PLI) .....	30
4.2.1 Physikalische Grundlagen der Polarisation .....	30
4.2.2 Verschiedene Zustände der Polarisation .....	32
4.2.3 Prinzip des Polarized Light Imaging .....	33
4.2.4 Aufbau und Handhabung der Polarisationsapparatur .....	36
4.2.5 Analyse der Polarisationssequenzen .....	38

5	Ergebnisse .....	41
5.1	Digitalisierung .....	41
5.2	Faserorientierungskarten .....	42
5.2.1	Supracallosaler Abschnitt des anterioren Cingulum .....	47
5.2.2	Prägenualer Abschnitt des anterioren Cingulum .....	50
5.2.3	Subgenualer Abschnitt des anterioren Cingulum .....	52
6	Diskussion .....	55
6.1	Methoden der Faserdarstellung im menschlichen Gehirn .....	55
6.2	Das menschliche Konnektom .....	59
6.3	Faseranatomie des anterioren Cingulum mittels PLI und MR-Verfahren .....	61
6.4	Methodenvergleich PLI und DTI .....	64
6.5	Anwendung von PLI in anderen Hirnregionen .....	67
6.6	3D-Rekonstruktion mittels PLI .....	68
7	Schlussfolgerung .....	70
8	Literaturverzeichnis .....	71
9	Anhang .....	83
9.1	Lebenslauf .....	83
9.2	Danksagung.....	84
9.3	Ehrenwörtliche Erklärung .....	85

## **1 Zusammenfassung**

Das Cingulum ist eine Assoziationsfaserbahn der weißen Substanz des menschlichen Gehirns, die den Gyrus cinguli mit dem Hippocampus verbindet. Wegen der Zwischenstellung zwischen Neokortex und limbischem System wird diese Hirnregion als Brücke zwischen Emotionen, Verhalten und Denken diskutiert. Aus diesem Grund ist das Cingulum Gegenstand zahlreicher neuroanatomischer Studien. Neuere Untersuchungen konnten Zusammenhänge zwischen Veränderungen des Gyrus cinguli und der Pathogenese neuropsychiatrischer Erkrankungen wie der Schizophrenie und bipolaren Störungen aufzeigen (Wang et al. 2007, Wang et al. 2008). Auch dem anterioren Cingulum wurde diesbezüglich in verschiedenen Arbeiten eine wesentliche Rolle zugeschrieben, sodass wissenschaftliche Erkenntnisse zum Faserverlauf in dieser Hirnregion von hohem klinischem Interesse sind. Auch im Hinblick auf Forschungsprojekte wie dem menschlichen Konnektom, welches neuroarchitektonische Aspekte und neuronale Funktionen integriert, ist die Erhebung neuroanatomischer Daten wissenschaftlich bedeutsam.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Analyse und der detaillierten Darstellung der Faserorientierung im anterioren Cingulum des menschlichen Gehirns mittels Polarized Light Imaging (PLI). Mit dieser Methode kann die Faserorientierung in jedem Voxel eines Dünnschnittpräparates berechnet werden und damit der Verlauf von Fasersystemen und Nervenbahnen hochauflösend dargestellt werden. Die physikalische Grundlage für dieses Verfahren bilden die doppelbrechenden Eigenschaften der myelinisierten Nervenfasern. Das Polarized Light Imaging ermöglicht somit eine detaillierte Abbildung der Faserorientierung der weißen Substanz im menschlichen Gehirn mit einer Auflösung im Mikrometerbereich.

In der vorliegenden Arbeit wurden sechs in formalinhaltiger Lösung konservierte menschliche Gehirne in ihre Hemisphären geteilt, die Region des anterioren Gyrus cinguli präpariert und anschließend seriell geschnitten. Diese 100 Mikrometer starken Schnitte wurden mithilfe einer eigens entwickelten Polarisationsoptik, einer Digitalkamera und eines PCs digitalisiert und archiviert. Durch standardisierte Anordnungen des Polarisationsfilters in der Polarisationsoptik mit und ohne Viertelwellenplatte entstanden 18 Einzelbilder je Hirnschnitt. Aus über 85.000 Einzeldatensätzen wurden mittels MATLAB-Algorithmus Intensitäts-, Neigungs- und



Richtungskarten erstellt und schließlich farbkodierte Faserorientierungskarten (FOM) des anterioren Cingulum berechnet.

Für die genaue anatomische Beschreibung und zum Vergleich der Ergebnisse wurde die topografische Einteilung des anterioren Cingulum in einen supracallosalen, prägenualen und subgenualen Abschnitt gewählt.

In der vorliegenden Arbeit stellt sich der supracallosale Abschnitt des Cingulums im anterioren Bereich als kompaktes Faserbündel dar, welches entlang des Corpus callosum zieht. Im posterioren Anteil sind Faservermischungen mit Strukturen der angrenzenden kortikalen Areale sichtbar. Der prägenuale Abschnitt präsentiert sich als gleichmäßiges Faserbündel ohne Faserein- oder Faserausstrahlungen, das von supracallosal um das Genu des Corpus callosum verläuft. In der subgenualen Region sind diffuse Vermischungen der Faserzüge mit Ausstrahlungen vor allem in die orbitofrontale Region und in Richtung des Limen insulae sichtbar. Die Darstellung der neuronalen Strukturen gelingt mit einer Auflösung von  $64\mu\text{m} \times 64\mu\text{m} \times 100\mu\text{m}$ .

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit komplettieren die Erkenntnisse zur Faseranatomie des anterioren Cingulum aus anderen Studien (Devinsky et al. 1995, Palomero-Gallagher et al. 2009, Vogt 2005). Ein wesentlicher Vorteil des PLI liegt in der hohen Auflösung der Faserdarstellung und der Möglichkeit, sowohl sehr kleine neuronale Abschnitte als auch lange Faserzüge abbilden zu können. Die Datenerhebung ist nicht in vivo möglich und bedarf gegenüber magnetresonanzbasierten Methoden eines hohen Arbeits- und Zeitaufwandes.

Dennoch vermögen die mesodimensionalen Daten, die mittels PLI gewonnen werden, die Lücke zwischen Makro- und Mikroebene zu schließen. PLI stellt eine unabhängige Methode zur Validierung der Ergebnisse magnetresonanzbasierter Verfahren dar und leistet, auch in Anbetracht der Möglichkeit zur dreidimensionalen Rekonstruktion, einen unverzichtbaren Beitrag zur Erstellung des menschlichen Konnektoms.

## 2 Einleitung

### 2.1 Gyrus cinguli

#### 2.1.1 Neuroanatomische Struktur

Der Gyrus cinguli ist im Bereich der medialen Großhirnrinde bilateral oberhalb des Corpus callosum lokalisiert und erstreckt sich bis zum Sulcus cinguli, einer markanten Furche der medialen Kortexoberfläche. Der cinguläre Kortex wurde erstmals 1878 von dem französischen Neuroanatom Broca in „le grand lobe limbique“ als eine sich um das Corpus callosum „gürtelförmig“ windende Hirnsubstanz beschrieben (Broca 1878). Abbildung 1 zeigt den anatomischen Verlauf des Gyrus cinguli (Abbildung 1). Ausgehend vom subgenualen Bereich (Rostrum) des Corpus callosum biegt er um das vordere Ende (Genu) des Balkens und zieht an dessen Oberkante entlang bis zum Gyrus parahippocampalis. Der Gyrus cinguli wird vom Balken makroskopisch nur durch einen schmalen Spalt getrennt. Die obere Begrenzung erfolgt durch den Sulcus cinguli (Gray 1918, Trepel 2008).

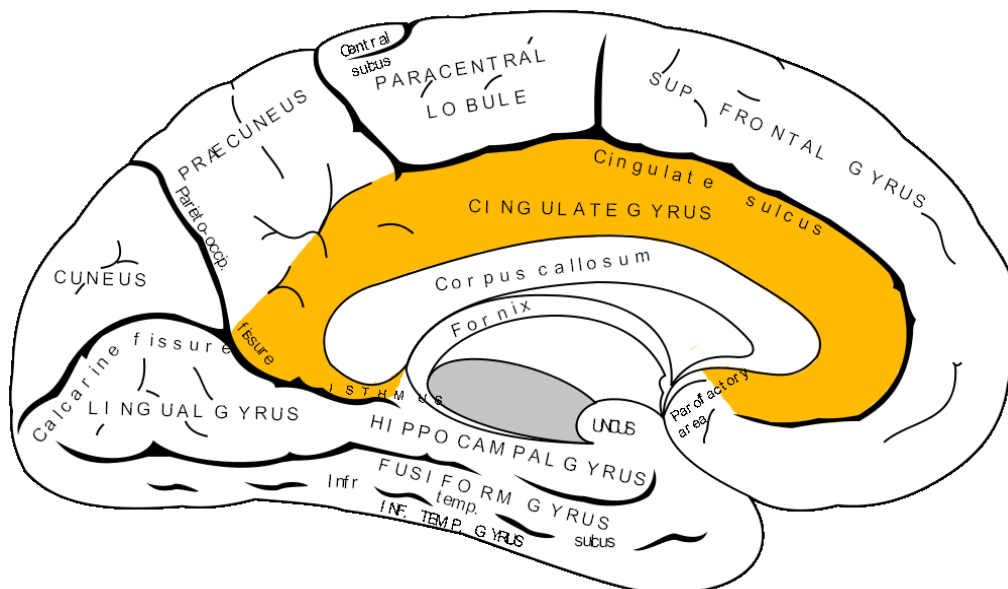
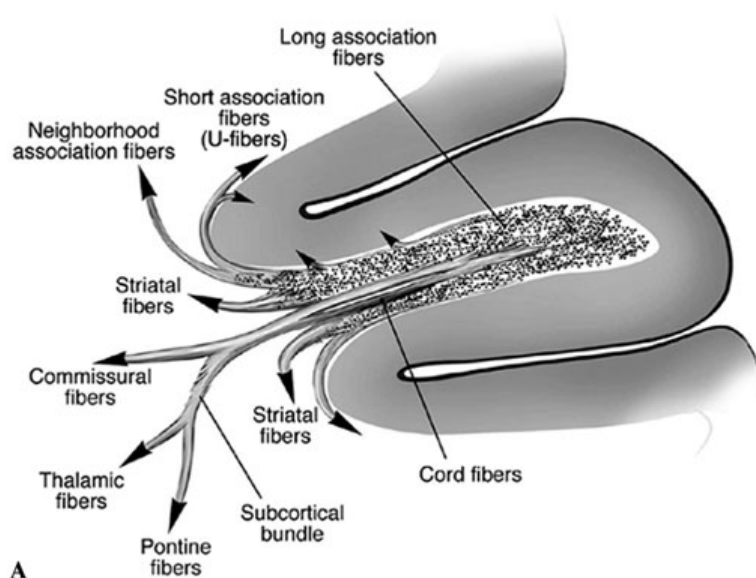


Abbildung 1: Mediale Ansicht der linken Großhirnhemisphäre, Gyrus cinguli gelb unterlegt (Gray 1918)

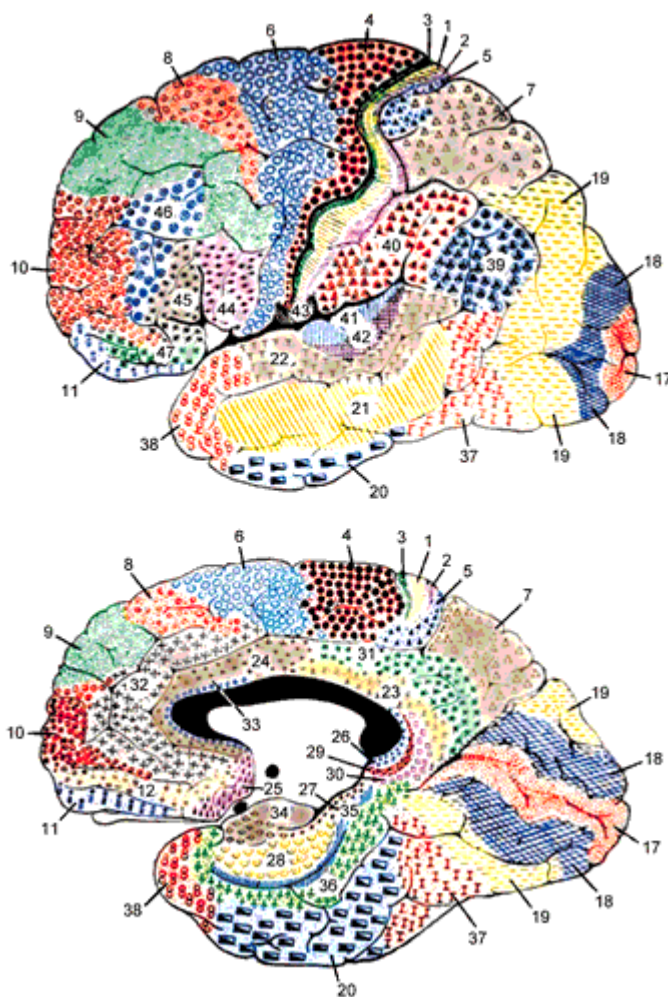
Das sogenannte Cingulum ist eine in der Tiefe des Gyrus cinguli lokalisierte Assoziationsfaserbahn des Großhirnmarks, welche den Gyrus cinguli mit dem Hippocampus verbindet. Somit stellt der Gyrus cinguli eine kortikale Struktur dar, die Faserzüge der weißen Substanz (in Form des Cingulum) beinhaltet. Deshalb wird das Cingulum strukturell dem Telencephalon, jedoch funktionell dem limbischen System zugeordnet. Durch diese Zwischenstellung zwischen Neokortex und limbischem System bestehen Projektionen mit anderen limbischen Strukturen, den Basalganglien, dem Nucleus ruber und dem Motorkortex, autonomen Kerngebieten im Hypothalamus und Hirnstamm sowie dem präfrontalen Kortex (Prosiegel und Paulig 2002). Damit werden der Gyrus cinguli beziehungsweise das Cingulum gewissermaßen zur Brücke zwischen Emotionen, Verhalten und Denken (Devinsky et al. 1995, Vogt et al. 1992, Vogt et al. 1995). Assoziationsfaserbahnen, wie beispielsweise das Cingulum, verlaufen typischerweise nur einseitig und verbinden einzelne Abschnitte einer Hemisphäre mit einander. Das unterscheidet sie von Projektionsbahnen, welche Anteile aus beiden Hemisphären beziehungsweise Körperhälften beinhalten, wie die Pyramidenbahn. Assoziationsfasern können zusätzlich in lange (zum Beispiel Cingulum, Fasciculus longitudinalis) und kurze Fasern differenziert werden. Die kurzen Faszikel, die auch als U-Fasern bezeichnet werden, verbinden benachbarte Kortexareale miteinander (*Abbildung 2*). Außerdem gibt es Kommissuren- beziehungsweise Transversalfasern, die unter anderem im Corpus callosum die interhemisphärische Verbindung und Koordination der Großhirnhälften ermöglichen (Schmidt 1979).



*Abbildung 2:* Faserbahnen im menschlichen Gehirn (Schmahmann und Pandya 2008)

Nach Brodmann wird das Cingulum strukturell und unabhängig von funktionellen Kriterien in verschiedene Abschnitte unterteilt: Pars anterior, welches dem Brodmann Areal 24 entspricht, Pars posterior (Area 23), Area subcallosa (Area 25) und den cingulären Motorkortex (Area 32).

Korbinian Brodmann (1868 bis 1918) erstellte anhand der histologischen Schichtung des Kortex eine der ersten und bis heute international bekannten Kartierungen des menschlichen Gehirns (Brodmann 1909). Diese 1909 beschriebene Rindenfeldgliederung unterteilt den Großhirnkortex in 52 Rindenfelder beziehungsweise Areale basierend auf der Zytoarchitektur der Hirnrinde (*Abbildung 3*).



Brodmann Areale des Großhirnkortex:

1- A. postcentralis intermedia, 2- A. postcentralis caudalis, 3- A. postcentralis oralis, 4- A. gigantopyramidalis, 5- A. praeparietalis, 6- A. frontalis agranularis, 7- A. parietalis superior, 8- A. frontalis intermedia, 9- A. frontalis granularis, 10- A. frontopolaris, 11- A. praefrontalis, 12- A. praefrontalis, 17- A. striata, 18- A. parastriata, 19- A. peristriata, 20- A. temporalis inferior, 21- A. temporalis media, 22- A. temporalis superior, 23- A. cingularis posterior ventralis, 24- A. cingularis anterior ventralis, 25- A. subgenualis, 26- A. ectosplenialis, 28- A. entorhinalis, 29- A. retrolimbica granularis, 30- A. retrolimbica agranularis, 31- A. cingularis posterior dorsalis, 32- A. cingularis anterior dorsalis, 33- A. praegenualis, 34- A. entorhinalis dorsalis, 35- A. perirhinalis, 36- A. ectorhinalis, 37- A. occipito-temporalis, 38- A. temporo-polaris, 39- A. angularis, 40- A. supramarginalis, 41- A. temporalis transversa anterior, 42- A. temporalis transversa posterior, 43- A. subcentralis, 44- A. opercularis, 45- A. triangularis, 46- A. frontalis media, 47- A. orbitalis, 48- A. retrosubicularis, 52- A. parainsularis (Areae 13, 14, 15, 16, 27, 49, 50, 51 werden nur beim Affen beschrieben)

*Abbildung 3:* Brodmann Areale des Großhirnkortex (Dubin 2005)

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass der cinguläre Kortex und speziell der anteriore cinguläre Kortex (ACC) eine ausgeprägte Heterogenität besitzt. Devinsky und Kollegen (Devinsky et al. 1995) unterteilen das anteriore Cingulum in Regionen für Affekt und Kognition. Die beschriebene „affect division“ schließt die Brodmann Areale 25, 33 sowie das rostrale Areal 24 ein und besitzt Verbindungen zur Amygdala sowie Teilen des Striatums und Thalamus. Aufgrund dessen wird diesem Bereich eine Funktion bei emotionalen Lernprozessen und Gefühlsentwicklung zugeschrieben. Im Vergleich dazu zählen zur „cognition division“ die kaudalen Areale 24 und 32, der cinguläre Motorkortex im Sulcus cinguli und

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass der cinguläre Kortex und speziell der anteriore cinguläre Kortex (ACC) eine ausgeprägte Heterogenität besitzt. Devinsky und Kollegen (Devinsky et al. 1995) unterteilen das anteriore Cingulum in Regionen für Affekt und Kognition. Die beschriebene „affect division“ schließt die Brodmann Areale 25, 33 sowie das rostrale Areal 24 ein und besitzt Verbindungen zur Amygdala sowie Teilen des Striatums und Thalamus. Aufgrund dessen wird diesem Bereich eine Funktion bei emotionalen Lernprozessen und Gefühlsentwicklung zugeschrieben. Im Vergleich dazu zählen zur „cognition division“ die kaudalen Areale 24 und 32, der cinguläre Motorkortex im Sulcus cinguli und

nozizeptivem Kortex mit Faserzügen zu präfrontalen und parietalen kortikalen Arealen. Dieser Bereich ist insbesondere in Motorik, Aufmerksamkeit und Schmerzwahrnehmung involviert (Devinski et al. 1995), (*Abbildung 4*).

In zahlreichen Untersuchungen wies die mediale Kortexoberfläche, speziell der cinguläre Kortex, interindividuelle Strukturvariationen auf. Es zeigen sich Unterschiede in Lage und Kontinuität des Sulcus cinguli (CS) sowie im Vorhandensein eines sogenannten paracingulären Sulcus (PCS) (Huster et al. 2007, Paus et al. 1996a, Paus et al. 1996b). Der PCS bezeichnet einen zusätzlichen Sulcus dorsal des Sulcus cinguli und kommt bei zirka 30-60% der Bevölkerung und häufiger links als rechts vor (Fornito et al. 2004). Dadurch wird der Gyrus cinguli in zwei einzelne, parallel zueinander verlaufende, Gyri unterteilt. Dadurch kann bei dieser anatomischen Variation ein einfacher oder doppelter (bei Vorkommen des PCS) beziehungsweise ein segmentierter oder nicht-segmentierter Gyrus cinguli unterschieden werden (Vogt et al. 1995, Yücel et al. 2001).

In den letzten Jahren und Jahrzehnten wurden durch neuroanatomische Forschung erweiterte und sehr spezielle Nomenklaturen für den cingulären Kortex erstellt.

Neuere Veröffentlichungen von Vogt und Palomero-Gallagher (Vogt 2005, Palomero-Gallagher et al. 2009) verwenden ein Modell bestehend aus vier Regionen („four region model“) mit diversen Subregionen auf Grundlage der Multirezeptor-Autoradiografie. Zu den vier Regionen dieses Modells gehören 1) der anteriore cinguläre Kortex (ACC) mit subgenualen (sACC) und prägenualen (pACC) Anteilen, 2) der midcinguläre Kortex (MCC) mit anteriorem Anteil (aMCC) und posteriorem Anteil (pMCC), 3) der posteriore cinguläre Kortex (PCC) mit dorsalem Abschnitt (dPCC) und ventralem Abschnitt (vPCC) und 4) der retrosplenische Kortex (RSC) (*Abbildung 5*). Es konnte gezeigt werden, dass die verschiedenen Subregionen mit einer spezifischen Rezeptorarchitektur assoziiert sind. Beispielsweise lassen sich ACC und MCC anhand ihres neurochemischen Rezeptorbesatzes signifikant voneinander abgrenzen. Der ACC hat höhere AMPA-, Glutamat-, alpha(2)-, 5-HT(1A)-, und D(1)-, aber die niedrigsten GABA(A)-Rezeptor-Dichten. Der MCC hingegen besitzt nur relativ wenige AMPA-, Glutamat-, alpha(2)-, und D(1)-Rezeptoren. In der Rezeptor-Architektur ist die Area 25 im anterioren Cingulum vergleichbar mit dem midcingulären Kortex. Der PCC unterscheidet sich vom RSC durch höhere M(1)- und alpha(1)-, aber niedrigere M(3)-Rezeptor-Dichten (Palomero-Gallagher et al. 2008, Palomero-Gallagher et al. 2009).

Aufgrund der Erkenntnisse über die strukturellen und funktionellen Unterschiede innerhalb der Regionen des Gyrus cinguli wird das duale Konzept von Brodmann zu Gunsten des neurobiologischen Vier-Regionen Modells von Vogt und Kollegen zunehmend verlassen.

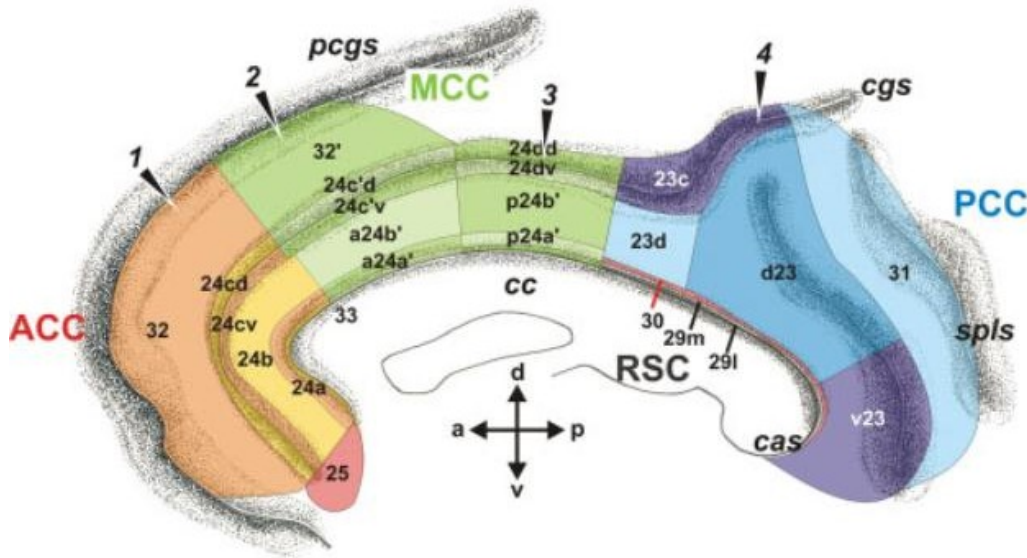


Abbildung 5: Das "four-region neurobiological model" mit zytoarchitektonischen Arealen. ACC (Areale 33, 25, 24a, 24b, 24cv, 24cd, 32) ist rot markiert; MCC (Areale 33, a24a', a24b', a24c', a24c'd, p24a', p24b', 24dv, 24dd) in grün; PCC (Areale 23d, 23c, d23, v23, 31) in blau; RSC (Areale 29l, 29m, 30) in grau. (Palomero-Galagher et al. 2009)

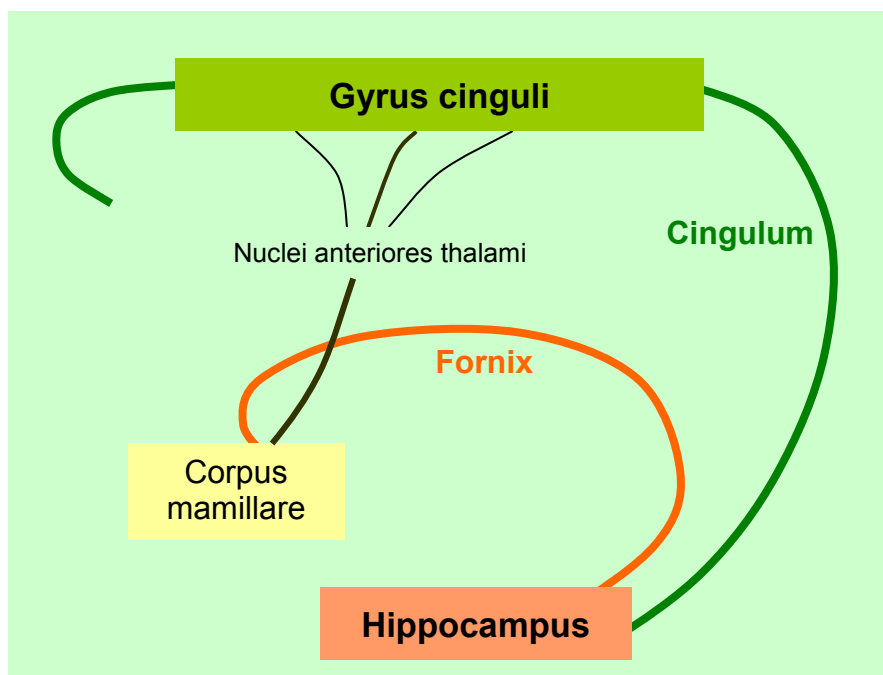
## 2.1.2 Limbisches System und Gyrus cinguli

Das limbische System stellt eine Gruppe mehrerer funktionell miteinander verbundener Regionen dar und lässt sich nicht als eigenständige Hirnstruktur abgrenzen. Typischerweise werden ihm das Corpus mamillare, der Gyrus cinguli, der Hippocampus mit Fornix, der Gyrus parahippocampalis sowie die Amygdala zugeordnet. Dem limbischen System wird eine entscheidende Rolle in Bezug auf Gedächtnisfunktion und emotionalem Verhalten zugeschrieben (Mark et al. 1993).

Der Begriff „limbic lobe“ wurde erstmals von Paul Broca (1824-1880) verwendet und geprägt. Obwohl dem limbischen System zunächst einzig die Funktion des Riechens zugeschrieben wurde (Allmann et al. 2001), konnte es ab 1930 durch dargestellte Verbindungen zu Kortex und Hypothalamus mit Verhalten und Emotionen assoziiert werden. Der Gyrus cinguli stellt ein Bindeglied zwischen limbischem System und



Neokortex dar und spielt deshalb eine zentrale Rolle im Papez-Kreis (Vogt et al. 1992), welcher 1937 erstmals von James Papez beschrieben wurde. Papez beobachtete bei Patienten mit verdrängendem Tumorwachstum im Bereich des Gyrus cinguli den Verlust der Spontanität von Emotionen, Motorik und Denken. Daraus mutmaßte er eine Verbindung zwischen den beiden Kreisläufen 1) Retina – Thalamus - Area striata und 2) Hypothalamus - Thalamus - Gyrus cinguli (Papez 1937). Diese Theorie stellte den ersten neurofunktionellen Ansatz zur Erklärung der Entstehung von Emotionen dar. Der heute verwendete Begriff des limbischen Systems wurde 1949 von Paul MacLean eingeführt und basiert auf dem Grundmodell von Papez. Neuere Studien haben die Aufgabe des limbischen Systems, Gedächtnisinhalte aufrechtzuerhalten, verifiziert und gezeigt, dass bereits der Ausfall einzelner Teile der Schaltstellen im Papez-Kreis zu anterograder Amnesie, bei erhaltenem Langzeitgedächtnis führen können (Bear et al. 2006, Trepel 2008). Abbildung 6 zeigt die Kette neuronaler Verschaltungen innerhalb des Papez-Kreises (Abbildung 6).



**Abbildung 6:** Papez-Kreis: Der Hippocampus projiziert zum Fornix, über diesen zu den Corpora mamillaria und von hier wiederum projizieren die Neurone über den Fasciculus mamillothalamicus („Vicq-d'Azur-Bündel“) zu den Nuclei anteriores thalami. Von dort geht die Verschaltung über den Tractus (Radiatio) thalamocingularis zum Gyrus cinguli, welcher durch seine Verbindung mit dem Hippocampus den Kreis schließt. (modifiziert nach Trepel 2008)



### 2.1.3 Funktion und Bedeutung des Gyrus cinguli

Der cinguläre Kortex umfasst infolge seiner ausgesprochenen Heterogenität zahlreiche funktionell spezialisierte Unterbereiche. Damit können sowohl kognitive und emotionale, als auch motorische, nozizeptive und visuell-räumliche Funktionen in einer Struktur vereint werden (Allmann et al. 2001, Vogt et al. 1992).

Der anteriore Teil des Gyrus cinguli ist vorwiegend für Emotionen und motorische Funktionen bedeutsam, während die posteriore Region einen großen Anteil an visuellen und Gedächtnisfunktionen, aber eine geringe Bedeutung für Affektion besitzt (Bush et al. 2000, Devinsky et al. 1995, Vogt et al. 1992).

Die verschiedenen Regionen des Gyrus cinguli, besonders des ACC und MCC, wurden in diversen Studien bezüglich ihrer Konnektivität zu anderen Hirnstrukturen und ihrer Funktion untersucht. Im Folgenden werden die cingulären Regionen und besonders das anteriore Cingulum näher dargestellt.

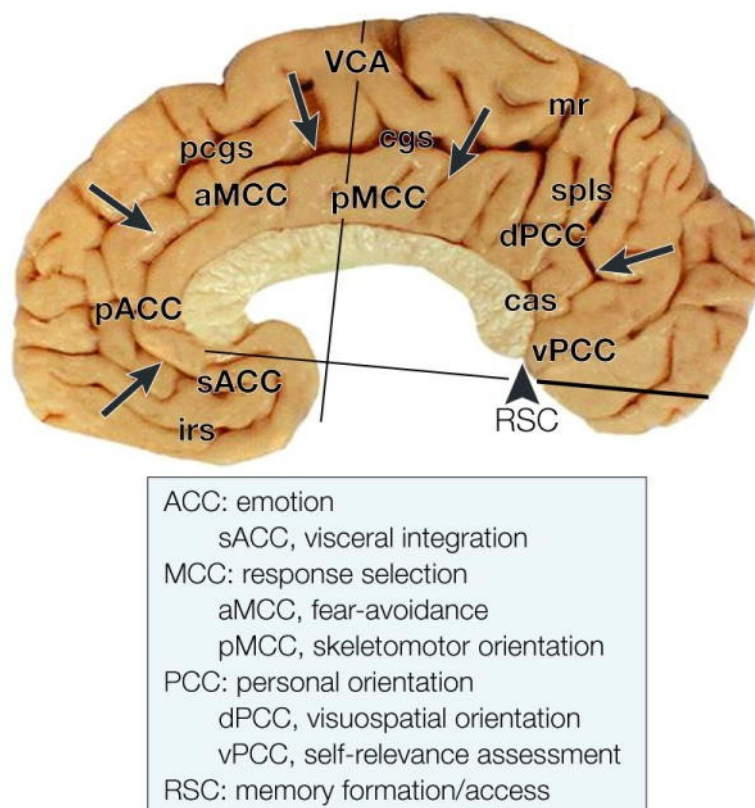
Der MCC zeichnet sich durch strukturelle und funktionelle Vielgestaltigkeit aus. Einerseits konnte der Einfluss des anterioren MCC auf Schmerz und Angstwahrnehmung gezeigt werden, weshalb eine Bedeutung bei chronischen Schmerz- und Stresssyndromen vermutet wird. Andererseits spielt der midcinguläre Kortex eine wichtige Rolle bezüglich der Aufmerksamkeit (Vogt et al. 2003).

Huster und Kollegen untersuchten in einer DTI-Studie die Effekte von Geschlecht und Händigkeit in Bezug auf die Mikro- und Makrostruktur des midcingulären Bündels (MCB). Dabei wurde eine höhere funktionelle Konnektivität des linken im Vergleich zum rechten MCB und bei Männern im Vergleich zu Frauen gefunden (Huster et al. 2009).

Den posterioren cingulären Arealen, bestehend aus dem PCC (Area 23 und 31) und dem RSC (Area 29 und 30), konnte eine entscheidende Bedeutung bei Gedächtnisfunktion und visueller Orientierung zugeordnet werden (Vogt et al. 1992, Vogt et al. 2006).

Der ACC stellt bezüglich Zytoarchitektur, Konnektivität und Funktion eine heterogene Struktur dar und wird in seiner Rolle bei der Verhaltenssteuerung und selektiven Aufmerksamkeit kontrovers diskutiert. Eines der Hauptmerkmale des ACC sind Projektionen zum Motorkortex und Rückenmark, welche vermutlich die motorische Kontrollfunktion ermöglichen. Des Weiteren weisen reziproke Verbindungen zwischen dem ACC und dem lateralen präfrontalen Kortex auf den kognitiven

Einfluss des ACC hin. Zusätzlich unterstützen die ausgedehnten Afferenzen der thalamischen Mittellinienkerne und der Hirnstammkerne zum ACC seine Relevanz in Bezug auf Antrieb und Dynamik des Organismus (Koski und Paus 2000, Paus 2001). Durch die Beteiligung an der motorischen Kontrolle, Kognition und Aufmerksamkeit wurde dem ACC eine einzigartige Position in Bezug auf die Umsetzung von Intensionen in Handlungen und Aktionen zugeschrieben (Paus 2001). In der folgenden Abbildung sind die Regionen und Subregionen des Gyrus cinguli dargestellt und deren wichtigste Funktionen zusammengefasst (*Abbildung 7*).



*Abbildung 7:* Gyrus cinguli mit vier Hauptregionen und Subregionen. Die Grenzen des Gyrus cinguli sind mit Pfeilen markiert. Abkürzungen: cas, callosal sulcus; cgs, cingulate sulcus; irs, inferior rostral sulcus; mr, marginal ramus of cgs; pcgs, paracingulate sulcus. (Vogt 2005)

Aktuelle Studien unter Verwendung von DTI oder fMRT beschäftigten sich vor allem mit der Untersuchung von Asymmetrien der fraktionierten Anisotropie (FA) des Gyrus cinguli. Die fraktionierte Anisotropie ist ein statistisches Verhältnis von

Diffusionsvektoren in Geweben, welches als Maß für die Nervenfaserverintegrität verwendet werden kann (Mori und Barker 1999, Mori und Zhang 2006). Gong und Kollegen konnten im linken Gyrus cinguli (besonders im posterioren Segment) eine größere Asymmetrie der fraktionierten Anisotropie feststellen als rechts, wobei in der Händigkeit keine signifikanten Unterschiede festgestellt wurden (Gong et al. 2005). De Groot und Kollegen verglichen ebenfalls linkes und rechtes Cingulum mit dem Ergebnis der höheren fraktionierten Anisotropie im linken anterioren Teil im Vergleich zur rechten Seite und dem gegensätzlichen Effekt im posterioren Teil (De Groot et al. 2009). Bei speziellen Untersuchungen der ACC-Subregionen von Mohanty und Kollegen mittels fMRT wurde die regionale Aktivität durch verschiedenen dargebotene Distraktorreize untersucht. Dabei führten Farb-Worte zur Mehr-Aktivierung im dorsalen ACC, während Emotions-Worte eine Mehr-Aktivität im rostralen ACC auslösten (Mohanty et al. 2007). Diese Untersuchungsergebnisse helfen den cingulären Kortex und das Cingulum in ihrer Funktionalität weiter zu verstehen, verdeutlichen aber auch, welche Komplexität diese Hirnstruktur in sich trägt.

#### 2.1.4 Klinische Bedeutung des anterioren Cingulum

Der anteriore Gyrus cinguli (ACC) ist ein wichtiger Teil des limbischen Systems und bezüglich emotionaler, kognitiver und ausführender Funktion des Organismus bedeutsam (Devinsky et al. 1995, Vogt et al. 1992, Vogt et al. 1995). Die verschiedenen strukturellen Subregionen des ACC können mit unterschiedlichen psychiatrischen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden (McCormick et al. 2006, Zetsche et al. 2007). Bei neuropathologischen Veränderungen im Bereich des anterioren Cingulum oder nach neurochirurgischen Eingriffen in dieser Hirnregion konnten Störungen verschiedener Funktionen sowie Verhaltensauffälligkeiten beobachtet werden. Auftretende Symptome waren beispielsweise Apathie, Aufmerksamkeitsstörungen, Dysregulation autonomer Funktionen, akinetischer Mutismus und emotionale Instabilität (Bush et al. 2000, Tow und Whitty 1953). Durch die anteriore Cingulotomie wurden bei schwerer Depression, Schmerzsyndromen und Zwangserkrankungen Symptomverbesserungen beobachtet. Die anteriore Cingulotomie ist eine neurochirurgische Intervention, bei der bilaterale Läsionen im anterioren Cingulum unter stereotaktischer Führung gesetzt werden (Steele et al.

2008, Whitty et al. 1952). Anhand langjähriger und aktueller Forschung war es möglich, strukturelle Veränderungen des anterioren Cingulum beim Vorliegen von Schizophrenie, bipolaren Störungen, Zwangsstörungen aber auch Autismus (Simms et al. 2009) und der Alzheimer-Erkrankung (Mielke et al. 2009, Xie et al. 2005) zu finden.

Das Cingulum und insbesondere das anteriore Cingulum befindet sich im Fokus der neuropsychiatrischen Erforschung der Schizophrenie.

Die Schizophrenie ist eine psychische Erkrankung, bei der die gesamte Persönlichkeit in unterschiedlicher Weise beeinflusst wird. Es können sich Wahrnehmung, Denken, Gefühle, Antrieb und Motorik der Betroffenen erheblich verändern. Das symptomatische Vollbild der Erkrankung geht mit Störungen von formalem Denken, Wahnphänomenen und Halluzinationen, Beeinträchtigung der Konzentration und Aufmerksamkeit, sowie Antriebsstörungen einher. Einerseits treten häufig Ich-Störungen und Eindrücke der Fremdbeeinflussung und Gedankenmanipulation auf, andererseits kommt es zur Veränderung der Affektivität mit innerer Unruhe, Spannungsgefühlen und Angstwahrnehmung der Erkrankten (Möller et al. 2009). Die Pathogenese der Schizophrenie ist bis heute noch nicht genau geklärt. Scheinbar begünstigen mehrere Faktoren die Entstehung der Erkrankung. Vermutlich spielen hierbei sowohl Vorbelastungen in der Familie, neurobiologische als auch psychologische und soziale Faktoren eine große Rolle (Lawrie et al. 2001). Eine zentrale Position scheint die genetische Prädisposition einzunehmen. Sind in einer Familie beispielsweise beide Eltern an einer Schizophrenie erkrankt, liegt das Risiko für ein gemeinsames Kind bei zirka 40 Prozent, ebenfalls eine Schizophrenie zu entwickeln. Hat ein Zwillingskind eine Schizophrenie, liegt das Risiko für das Geschwisterkind bei eineiigen Zwillingen bei fast 50 Prozent und bei zweieiigen bei zirka 15 Prozent. Diese Zwillingsstudien zeigen, dass die Vererbung bei der Genese der Schizophrenie eine wichtige Rolle spielt (Alanen 2001, Gottesman 1991). Aber auch biochemische Faktoren, Infektionen während der Schwangerschaft oder Komplikationen unter der Geburt können die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten der Erkrankung erhöhen (Brown et al. 2000). Häufige Auslöser einer Schizophrenie sind Drogenkonsum, Stresssituationen oder besonders belastende Lebensereignisse. In Deutschland und den westeuropäischen Ländern beträgt die Prävalenz schizophrener Psychosen zirka 0,5 bis 1 Prozent (Möller et al. 2009). Die Wahrscheinlichkeit eines Menschen,

im Laufe seines Lebens an Schizophrenie zu erkranken, wird auf etwa 1 Prozent geschätzt. Frauen und Männer sind etwa gleich häufig betroffen und erkranken meist zwischen der Pubertät und dem 30. bis 35. Lebensjahr (Alanen 2001, Möller et al. 2009).

Zahlreiche Studien konnten bei Schizophrenie-Erkrankten eine Volumenreduktion im gesamten Gehirn, Teilen des präfrontalen Gyrus und verschiedenen Teilen des Temporallappens (medial und superior) im Vergleich zu gesunden Probanden demonstrieren (Lawrie und Abukmeil 1998, Lawrie et al. 2004, Wright et al. 2000). In postmortalen Untersuchungen von Gehirnen Schizophrenie-Erkrankter wurden Veränderungen in der Zytoarchitektur im ACC beschrieben (Benes 1993).

In den letzten Jahren wurden genetische Risikofaktoren für die Entstehung einer Schizophrenie identifiziert (Craddock et al. 2005, Lewis et al. 2003). Hierzu zählen Veränderungen im COMT-Gen (Catechol-O-Methyltransferase) und im Neuregulin-1-Gen (NRG1), welchem eine Funktion bei der Entwicklung der weißen Substanz und der Myelinisierung im Zentralnervensystem zugeschrieben wird (Konrad und Winterer 2008, Lawrie et al. 2008, Park et al. 2001). In einer Studie von Lawrie und Kollegen wurde bei Testpersonen mit COMT-Val-Allel eine reduzierte Dichte der grauen Substanz im ACC und eine gesteigerte fMRI-Aktivierung im lateralen präfrontalen Kortex sowie im anterioren und posterioren Cingulum registriert. Für das Risiko-Allel der NRG1-Promotorregion wurde eine Assoziation mit psychotischen Symptomen, herabgesetztem Intelligenzquotienten und reduzierter Aktivierung im präfrontalen und temporalen Lappen gezeigt. Das NRG1-Gen scheint somit ein Risikofaktor für einen erweiterten oder intermediären Phänotyp zu sein, während das COMT-Val-Allel mit einem erhöhtem Risiko bei Patienten mit familiärer Belastung assoziiert ist (Lawrie et al. 2008). Wang und Kollegen untersuchten die NRG1-Gen-Variationen im ACC bei Schizophrenie-Patienten und konnten dabei signifikante Genotypinteraktionen feststellen (Wang et al. 2009).

In verschiedenen Studien konnte ein Zusammenhang zwischen Veränderungen im anterioren Cingulum und Schizophrenie gezeigt werden (Kubicki et al. 2003, Sun et al. 2003, Wang et al. 2004). Zu den genannten Veränderungen des ACC zählen ein dünnerer Kortex und herabgesetztes kortikales Volumen (Wang et al. 2007), ein vermindertes gyrales Volumen (Baiano et al. 2007), kleinere Pyramidenzellen (Bouras et al. 2001), eine veränderte räumliche Anordnung von Neuronen (Benes und Bird 1987), eine selektive Gliazellreduktion im Brodmann Areal 24 (Stark et al.

2004) und eine geringere N-Acetylaspartat-Konzentrationen (Wood et al. 2007). Die Entstehung der Schizophrenie könnte somit ein Ergebnis von neuronalem Verlust oder neuronaler Dysfunktion im Bereich des ACC sein. DTI-Studien demonstrierten eine verminderte Anisotropie des cingulären Bündels bei Schizophrenie-Patienten (Sun et al. 2003). In PET-Studien wurde ein Hypometabolismus im ACC bei Schizophrenie-Patienten gezeigt (Haznedar et al. 2004). Zusammenfassend finden sich mannigfaltige Zusammenhänge zwischen strukturellen Veränderungen im ACC und der Pathogenese psychotischer Erkrankungen, insbesondere der Schizophrenie (Segal et al. 2009, Yücel et al. 2003).

Bekannterweise gehen auch bipolare Störungen mit Veränderungen der weißen Substanz einher. Aufgrund der Verbindungen zum corticolimbischen System steht vor allem das anteriore Cingulum im Fokus der Forschung. In Studien von Wang und Kollegen zeigten Patienten mit bipolaren Störungen eine signifikant herabgesetzte fraktionierte Anisotropie im Bereich des anterioren Cingulum (Wang et al. 2008). Diese Ergebnisse haben einen hohen Stellenwert bezüglich der sich daraus ableitbaren Behandlungsmöglichkeiten von affektiven Störungen. So zeigte eine Studie zur Tiefenhirnstimulation proximal des anterioren Cingulum eine Wirksamkeit bei der Behandlung von Depressionskranken (Mayberg et al. 2005). Diese Methode führte auch bei Zwangsstörungen, die mit Veränderungen im cingulären Bündel und Anteilen der Capsula interna assoziiert sind, zur Besserung der Symptomatik (Cannistraro et al. 2007, Nuttin et al. 2003).

Darüber hinaus finden sich Veränderungen des Cingulums bei milden kognitiven Störungen und der Alzheimer-Erkrankung. Mittels DTI konnte auch bei diesen Krankheitsbildern eine signifikant verminderte fraktionierte Anisotropie dargestellt werden, mit deutlichen Veränderungen vor allem im posterioren Bereich bei ausgeprägter Alzheimer-Erkrankung (Mielke et al. 2009, Zhang et al. 2007). Weitere Studien können zum Verständnis der Bedeutung des Cingulum bei der Pathologie dementieller Erkrankungen beitragen und sind zur Entwicklung von Früherkennungsmethoden und der Etablierung neuer Therapieansätze von hohem wissenschaftlichem und klinischem Interesse.

## 2.2 Möglichkeiten zur Darstellung der Faseranatomie

Seit Ende des 19. Jahrhunderts steht die Darstellung und Beschreibung der Architektur des menschlichen Gehirns im Mittelpunkt der Forschung und damit auch die Entwicklung neuer Techniken zur Darstellung von Nervenfasern und deren Verknüpfungen.

Das menschliche Zentralnervensystem unterteilt sich generell in graue und weiße Substanz. Die graue Substanz beinhaltet die Zellkörper der Neurone und zahlreiche kurzstreckige Verbindungen. Die weiße Substanz besteht aus unzähligen vermischten unverzweigten Nervenfasern, den langstreckigen Axonprojektionen, welche die Neurone der grauen Substanz mit anderen Kerngebieten der grauen Substanz verbinden. Kenntnisse über die Architektur der weißen Substanz zur Erforschung neurokognitiver Prozesse sind daher von wesentlicher Bedeutung (Griffin 1994).

Die klinische Relevanz der Assoziationsbahnen des menschlichen Gehirns wurde im Wesentlichen durch Carl Wernicke (1848-1900) und Joseph Jules Dejerine (1849-1917) verdeutlicht, welche die Leitungsaphasie oder die reine Dyslexie mit Läsionen von Faserzügen der weißen Substanz in Verbindung brachten (Wernicke 1874, Dejerine 1895). Diskonnektivitätssyndrome wurden erstmals von Norman Geschwind (1926-1984) beschrieben und setzten den klinischen und neuroanatomischen Impuls für die Entstehung der Verhaltensneurologie als eigenständige Disziplin (Geschwind 1965). Diese Erkenntnisse waren fundamental für das Verständnis des Zentralnervensystems in Gesundheit und Krankheit. Es wurde deutlich, dass verhaltensneurologische Defizite nicht allein aufgrund von kortikalen Läsionen oder Störungen der Basalganglien, des Thalamus und des Zerebellums entstehen, sondern ebenso durch Veränderungen der Faserzüge, die diese kortikalen Regionen miteinander oder mit subkortikalen Bereichen verbinden, bedingt sein können (Schmahmann und Pandya 2006, Schmahmann und Pandya 2008).

Voraussetzung für das Verständnis der Pathologie der weißen Substanz sind Kenntnisse zur neuroanatomischen Struktur dieser Faserzüge. Jedes Gebiet des Neokortex steht mit anderen kortikalen und subkortikalen Regionen in Verbindung. Es lassen sich im menschlichen Gehirn fünf verschiedene Fasergruppen klassifizieren: 1) kortiko-kortikale Assoziationsfasern, 2) kortiko-striatale Fasern, 3) Kommissurenfasern zwischen den Hemisphären, 4) kortiko-subkortikale

Projektionsfasern, welche den Kortex mit dem Thalamus verbinden, und 5) kortiko-subkortikale Projektionsfasern, welche den Kortex mit dem pontozerebellären System, Hirnstamm und Rückenmark verbinden. Der Ausfall beziehungsweise die Schädigung der Faserbündel bedingen verschiedene Veränderungen oder Krankheiten abhängig von der Funktion der betroffenen Fasern. Läsionen der Assoziationsfaserbündel wirken sich beispielsweise auf die Kommunikation von Hirnarealen aus, die für die Verhaltenssteuerung im menschlichen Gehirn relevant sind (Schmahmann und Pandya 2008).

Verschiedene Methoden zur Darstellung der weißen Substanz haben wesentlich zum Verständnis der Faseranatomie beigetragen. Mit zunehmendem technischen Fortschritt wurden auch die Möglichkeiten der strukturellen und funktionellen Bildgebung erweitert. In Abbildung 8 sind verschiedene Darstellungsmethoden der weißen Substanz aufgeführt (Abbildung 8).

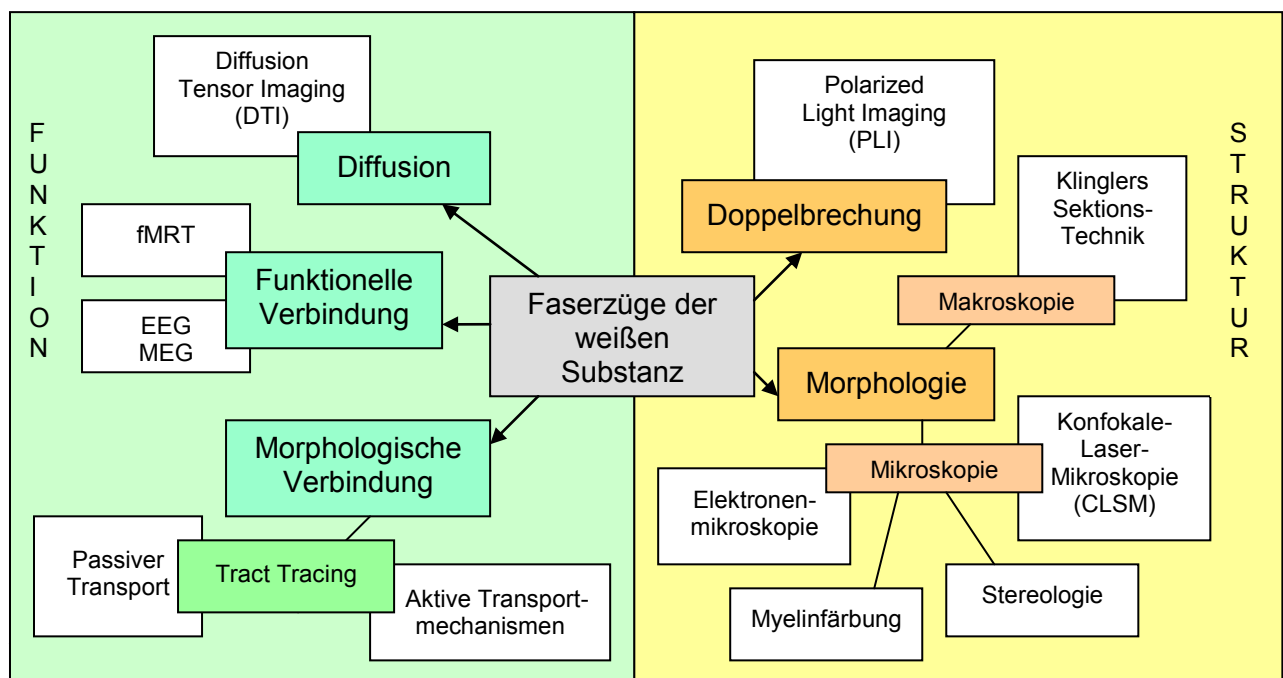
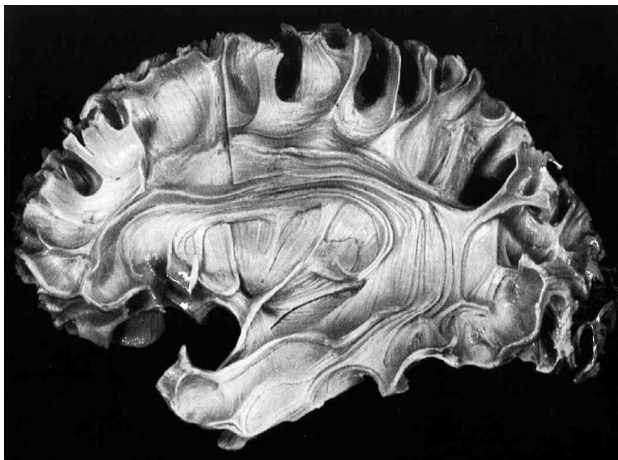


Abbildung 8: Übersicht der möglichen Darstellungsmethoden der weißen Substanz in Beziehung zu Struktur und Funktion. (modifiziert nach Axer H et al. 2011)

Die Faserdarstellung der weißen Substanz im menschlichen Gehirn war auch in der Vergangenheit das Ziel wissenschaftlicher Bemühungen. In der klassischen neuroanatomischen Arbeit von Dejerine waren Weigert-gefärbte, das heißt Myelin-



spezifisch gefärbte, histologische Gehirnschnitte die Grundlage für einen detaillierten Atlas mit zweidimensionaler Darstellung des Verlaufs der großen Faserzüge der weißen Substanz (Dejerine 1895). In der Mitte des zwanzigsten Jahrhunderts ermöglichte die makroskopische Klingler-Sektionstechnik mit Gefrierpräparation die dreidimensionale Darstellung der weißen Substanz (Ludwig und Klingler 1956). Hierbei erfolgt die Separation der Faserstrukturen durch mehrmaliges Einfrieren und wiederholte Präparation des Hirngewebes (*Abbildung 9a und 9b*).



*Abbildung 9a:*  
Präparat der linken Hemisphäre in  
Klingler-Sektionstechnik. (Ludwig und  
Klingler 1956)



*Abbildung 9b:*  
Laterale Ansicht der inneren Strukturen  
der linken Großhirnhemisphäre. (Ludwig  
und Klingler 1956)

Es folgten Versuche mit sogenanntem „Tract-Tracing“, bei dem der intraaxonale Transport von Meerettich-Peroxidase, Cholera-toxin, Fluoro-Gold, neurotrophen Viren oder radioaktiven Aminosäuren zur Darstellung von Nervenfaserverbindungen verwendet wurde. Diese Methode setzt aktive Transportmechanismen der neuronalen Strukturen voraus, erwies sich jedoch als ungeeignet für Untersuchungen am menschlichen Gehirn (Catani et al. 2002, Heimer und Zaborszky 1989, Lanciego und Wouterlood 2000).

Eine bedeutende Weiterentwicklung in der Visualisierung von Faserbahnen der weißen Substanz verspricht das Polarized Light Imaging (Axe et al. 2000), welches die Grundlage der vorliegenden Arbeit bildet. Bei dieser Methode werden die Charakteristika des polarisierten Lichts genutzt, um anhand der doppelbrechenden Eigenschaften der Myelinscheiden die Darstellung der Faserorientierung im Gehirn

zu ermöglichen. Mittels Polarized Light Imaging entstehen somit farbkodierte Faserorientierungskarten von Faserzügen der weißen Substanz.

Nicht-invasive Verfahren basieren auf der Magnetresonanz-Bildgebung und nutzen die messbaren Unterschiede der Eigendiffusion von Wasser in verschiedenen Hirnregionen. Diese Eigenschaft des Wassers in einem anisotropen System wie der weißen Substanz kann nicht anhand einer einzigen Skala quantifiziert werden. Deshalb muss die Verteilung des Wassers mittels Diffusionstensors, einer symmetrischen 3x3 Matrix, die das dreidimensionale Diffusionsverhalten beschreibt, gemessen werden. DTI (Diffusion Tensor Imaging) ist eine Methode, die die Wasserdiffusion im lebenden Gehirn messen kann (Basser et al. 1994, Crank 1956). In der weißen Substanz erzeugen, die dicht beieinander liegenden Faserstrukturen eine „anisotrope“, das heißt eine gerichtete Diffusion. Die Diffusion mit der Faserachse verläuft dabei schneller als die Diffusion senkrecht zur Faserachse. Somit ermöglicht die Messung des Diffusionsverhaltens die Detektion der räumlichen Orientierung der Faserzüge der weißen Substanz (Mori und Zhang 2006, Moseley et al. 1990). Das DTI nimmt damit einen hohen Stellenwert in der Erforschung der Anatomie, Funktion und Pathologie des menschlichen Gehirns ein. Ein Problem der DTI-Studien besteht im relativ niedrigen Auflösungsvermögen des Diffusions-MRT, das im Millimeterbereich liegt. Darüber hinaus fehlen nach wie vor Methoden der Validierung der Ergebnisse anhand einer verständlichen und detaillierten anatomischen Darstellung der Faserzüge. Die bekannte Anatomie des Gehirns als Basis zur aktuellen Interpretation der Forschungsergebnisse ist in ihrer strukturell-funktionellen Genauigkeit nur wenig fundiert, basiert auf der klassischen Dissektionsmethode nach Klingler und stellt laut aktuellen Veröffentlichungen nur eine ungenügend validierte Referenzgrundlage dar (Schmahmann et al. 2007). Eine mögliche Variante zur Validierung der DTI-Daten ist die Verwendung des Polarized Light Imaging, welches deutlich präzisere Informationen zur räumlichen Orientierung der Faserzüge anhand histologischer Schnitte liefert und eine Auflösung im Mikrometerbereich ermöglicht (Axe et al. 2001).

Makris und Kollegen nutzten farbkodierte Faserorientierungskarten auf Grundlage von DTI-Daten in Kombination mit dem anatomischen Wissen über die Bahnen der weißen Substanz, um zweidimensionale Bilder zum Verlauf der Hauptfaserbahnen zu berechnen (Makris et al. 1997). Die Visualisierung der dreidimensionalen Morphometrie einzelner Faszikel in ihrer Gesamtheit lässt sich nur schwer in einem

zweidimensionalen Format darstellen. Dieses Problem wird durch eine weitere Technik auf Grundlage des DTI gelöst, dem sogenannten “fiber tracking”, das auch als Traktografie bezeichnet wird (Basser et al. 2000; Mori und van Zijl 2002). Mit dieser dreidimensionalen Rekonstruktionsmethode wird die Identifikation der Faserverläufe der weißen Substanz gegenüber der zweidimensionalen Darstellung verbessert und die dreidimensionale Neuroanatomie erstmals im lebenden Menschen gezeigt (Catani et al. 2002, Concha et al. 2005). Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass mittels DTI-Traktografie präzise Beschreibungen der Anatomie der weißen Substanz und deren Pathologie erstellt werden können.

Ein neues Verfahren der Magnetresonanz-Bildgebung ist das Diffusion Spectrum Imaging (DSI), welches sowohl am lebenden Organismus als auch an postmortalem Gewebe anwendbar ist. Das DSI wurde von dem Neurowissenschaftler van Wedeen entwickelt und stellt eine dreidimensionale Diffusions-Funktion in jedem Voxel des Gehirns dar. Daraus resultieren Diffusionskarten mit sechsdimensionalen Bildern, wodurch die Diffusionsunterschiede innerhalb eines Voxels, die durch die kreuzenden neuronalen Bahnen entstehen in einer genauen Kartierung der Axonprojektionen dargestellt werden können (Wedeen et al. 2005). In DSI-Studien am Affengehirn (Schmahmann et al. 2007) und menschlichen Gehirn wurde unter anderem die Darstellung des cingulären Bündels demonstriert und damit das Potenzial des DSI für sensitive und eindeutige Messungen der Faserbündel gezeigt (Hagmann 2006, Wedeen et al. 2005, Wedeen et al. 2008).

Zur Abbildung und Analyse der Faserzüge der weißen Substanz existieren zahlreiche verschiedene Methoden, die jedoch nicht alle zur Anwendung am menschlichen Gehirn geeignet sind. Jede Methode besitzt spezifische Vor- und Nachteile und stellt meist nur spezielle Aspekte der weißen Substanz dar. Die Komplettierung der Erkenntnisse zur Faseranatomie im menschlichen Gehirn ist, wie oben dargestellt, von hohem klinischem und wissenschaftlichem Interesse. Sie bilden die Grundlage zum Verständnis von Diskonnektivitätssyndromen, neuropsychiatrischer Erkrankungen wie der Schizophrenie und degenerativen Erkrankungen der weißen Substanz. Zur Entwicklung neuer Therapieansätze und Therapieverfahren ist die multidimensionale und verschiedenmethodische Darstellung der Faseranatomie grundlegend notwendig. Um einem Teilaspekt dieses Anspruchs gerecht zu werden beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit der mikrostrukturellen Analyse des anterioren Cingulum-Bündels mittels Polarized Light Imaging.

### **3 Ziele der Arbeit**

Es liegen bislang keine Studien vor, in denen die Faserorientierung im anterioren Cingulum mittels Polarized Light Imaging (PLI) untersucht wurde.

Diese Hirnregion rückt jedoch zunehmend in den Fokus der klinischen Forschung, da sie wesentlich an neuropsychiatrischen Krankheitsbildern wie der Schizophrenie und affektiven Störungen beteiligt zu sein scheint. Für ein zunehmendes Verständnis und die Erforschung dieser Krankheitsbilder sind das Wissen über neuroanatomische Strukturen sowie die Darstellung der Faserorientierung dieser Region von hohem wissenschaftlichem und klinischem Interesse. Die hochauflösende Abbildung spezieller Faserverbindungen des anterioren Cingulum sowie der Faservermischungen mit anderen kortikalen Arealen ist deshalb von grundlegender Bedeutung.

Wie bereits oben aufgeführt wurde, existieren unterschiedliche Methoden zur Darstellung der Faseranatomie im menschlichen Gehirn. Magnetresonanzbasierte Verfahren wie das Diffusion Tensor Imaging (DTI) ermöglichen die in-vivo-Darstellung der weißen Substanz und werden wegen ihrer relativ unkomplizierten Handhabung in zahlreichen Studien angewendet. Um die gewonnenen Ergebnisse validieren zu können, sind neuroanatomische Untersuchungen mit anderen Methoden, wie dem hier angewendeten PLI, als Vergleichsgrundlage notwendig.

Außerdem ist die Integration der Ergebnisse der unterschiedlichen Untersuchungsverfahren notwendig, um das menschliche Gehirn als komplexes neuronales Netzwerk erfassen zu können. Zur Komplettierung des menschlichen Konnektoms bedarf es somit der Zusammenführung der Erkenntnisse zu unterschiedlichen Hirnregionen mit voneinander unabhängigen Methoden. Die mikrostrukturelle Analyse des anterioren Cingulum-Bündels mittels PLI kann durch die mesodimensionale Darstellung der Faseranatomie dieser Hirnregion einen Teilaspekt zur Datensammlung des menschlichen Konnektoms liefern und die Lücke zwischen Makro- und Mikroebene ergänzend ausfüllen. In vorherigen Studien der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Darstellung größerer Fasersysteme, wie der Pyramidenbahn, mittels PLI möglich ist.

Aus den oben genannten Gründen ist die mikrostrukturelle Analyse des anterioren Cingulum-Bündels mittels PLI wissenschaftlich und klinisch bedeutsam. Für eine

umfassende Darstellung der Faseranatomie dieser Hirnregion wurden in der vorliegenden Arbeit folgende Teilaspekte bearbeitet:

1. Präparation und Erstellen von Dünnschnittpräparaten des anterioren Gyrus cinguli von formalin-fixierten menschlichen Gehirnen
2. Digitalisierung der Dünnschnittpräparate mit verschiedenen Einstellungen der Polarisationsoptik als methodische Grundlage des PLI
3. Erstellen von Intensitätskarten, Faserrichtungs- und Faserneigungskarten des anterioren Cingulum-Bündels
4. Berechnung von farbkodierten Faserorientierungskarten (FOM) des anterioren Cingulum-Bündels
5. Auswertung der gewonnen Daten im Hemisphärenvergleich, interindividuell und im Vergleich zu Daten anderer Methoden

In Anbetracht der hochauflösenden Darstellung und der Option einer dreidimensionalen Rekonstruktion könnte durch die Faserdarstellung der weißen Substanz mittels PLI zukünftig die Grundlage geschaffen werden, um neue Therapieansätze neuropsychiatrischer Krankheitsbilder zu finden oder moderne neurochirurgische Eingriffe zu unterstützen.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Präparation und Erstellung der Dünnschnittpräparate

Die Daten der vorliegenden Dissertation wurden unter Verwendung von sechs humanen Gehirnen gewonnen (*Tabelle 1 und Tabelle 2*). Die Gehirne stammen von Körperspendern und wurden dankenswerterweise vom Institut für Anatomie des Uniklinikums Aachen (RWTH Aachen) zur Verfügung gestellt. Eine Einverständniserklärung, ihre Körper nach dem Tode für anatomische Studien zur Verfügung zu stellen, wurde erteilt. Anamnestisch waren weder neurologische noch psychiatrische Erkrankungen eruierbar.

Gehirn	55-01	39-01	35-01	05-04	08-05	05-02
Alter	87	75	72	84	77	81
Geschlecht	m	m	m	w	m	w

*Tabelle 1:* Alters- und Geschlechtsverteilung der verwendeten Hirne

Durchschnittsalter	79 Jahre
Altersbereich	72 bis 87 Jahre
Geschlechtsverteilung	4 männlich/ 2 weiblich

*Tabelle 2:* Statistische Angaben

Nach der Entnahme und Präparation aus dem knöchernen Schädel wurden die Gehirne für mindestens drei Wochen in 4%iger wässriger Formalinlösung fixiert und aufbewahrt. Es folgte die vorsichtige Präparation und Entfernung der Hirnhäute und Gefäße. Im Weiteren wurden die Hemisphären im Bereich des Corpus callosum entlang der Mittellinie getrennt und frontal des Sulcus centralis (Zentralfurche) entlang der obere Mantelkante geschnitten. Anschließend wurde ein 1,5 cm dickes Präparat des frontalen Anteils der Hemisphäre parallel zur medialen Kortexoberfläche abgetrennt (*Abbildung 10*). Das verbleibende Gewebe wurde für weitere Forschungszwecke konserviert.



*Abbildung 10:* Makroskopisches Präparat der rechten und linken anterioren medialen Großhirnhälfte

Die 1,5 cm dicken Scheiben der medio-frontalen Großhirnhälften wurden in vier separate Blöcke geschnitten, das heißt pro Gehirn entstanden acht einzelne Gewebeteile.

Um das Material auf ebenen Auflageflächen in gleichmäßige Präparate zu schneiden, wurden die Blöcke in flüssiger Gelatine gebettet und erkalteten über Nacht. Das Aushärten der Gehirnböcke erfolgte in 4%iger Formalinlösung bei 4° Celsius für zirka 3 bis 7 Tage. Zur Kryoprotektion wurden die Proben vor dem Schneiden dreimal (über 24 Stunden) in PBS-Pufferlösung (Phosphat gepufferte Salzlösung) gespült, anschließend in 10%iger Saccharose/PBS-Lösung und abschließend in 20%iger beziehungsweise 25%iger Saccharose/PBS-Lösung bei 4° Celsius inkubiert (Dauer: 3 bis 4 Tage, Haltbarkeit: bis zu 3 Wochen), (*Abbildung 11*), (*Tabelle 3*).

Am Kryomikrotom (Leica Microsystems, Typ: CM 3050 S, Bensheim) wurden die in Gelatine eingebetteten Präparate bei einer Kammer- und Objekttischtemperatur von -12° bis -15°C in einem Winkel von 3° in 100µm dicke, serielle Schnitte überführt. Nach erneutem Waschen in PBS-Pufferlösung und Auftauen der Schnitte wurden diese auf gelatinierte Objektträger aufgezogen. Abschließend erfolgte das Eindecken

der noch feuchten Schnitte im wasserlöslichen Einbettungsmedium Aquatex (Merck, Darmstadt) ohne Färbung mit einem Deckplättchen (Menzel-Gläser, Braunschweig).



Abbildung 11: Je vier Blöcke einer Hemisphäre des menschlichen Gehirns in Gelatine eingebettet.

<b>10%ige Gelatine (500ml)</b>	<b>10% Saccharose/PBS Lsg.</b>
50g pulverförmige Gelatine in 400 ml Aqua dest. auflösen, anschließend mit Aqua dest. auf 500ml Lösung auffüllen	40g D(+)Saccharose in 400ml PBS auflösen
<b>PBS (einfach)</b>	<b>20% Saccharose/PBS Lsg.</b>
80,06g NaCl (137mM), 2,00g KCl (2,7mM), 17,80g NaHPO (10mM), 2,70g KHPO (2,70mM) auf 1 l mit Aqua dest. auffüllen, anschließend auf 10l Lösung mit Aqua dest. auffüllen	80g D(+)Saccharose in 400ml PBS auflösen
	<b>25% Saccharose/PBS Lsg.</b>
	100g D(+)Saccharose in 400ml PBS auflösen

Tabelle 3: Verwendete Puffer und Lösungen

Pro Hemisphäre entstanden vier Blöcke mit jeweils 90 bis 120 Schnitten, das heißt es wurden bis zu 950 Schnitte pro Gehirn digitalisiert. Die Digitalisierung erfolgte mittels Polarisationsoptik in Kombination mit einer Bildverarbeitungseinheit (Pentium



PC). Von jedem einzelnen der seriellen Gehirnschnitte des anterioren Cingulum wurde auf Grundlage der doppelbrechenden Eigenschaften der weißen Substanz eine Sammlung umfangreicher Datensätze erzeugt. Mit Hilfe dieser Datensätze können Aussagen über die Orientierung einzelner Faserverläufe getroffen werden und farbkodierte Faserorientierungskarten der supracallosalen, prägenualen und subgenualen Anteile des Cingulum erstellt werden.

## 4.2 Polarized Light Imaging (PLI)

Das Polarized Light Imaging (PLI) ist eine Methode zur Darstellung der Faserorientierung im menschlichen Gehirn auf Grundlage der charakteristischen doppelbrechenden Eigenschaften von myelinisierten Nervenfasern. Dadurch wird die histologische Kartierung der weißen und grauen Substanz im menschlichen Gehirn mit sehr hoher Auflösung möglich. Die Orientierung der Nervenfasern in Kombination mit der variablen Anordnung der Polarisationsapparatur bewirkt die Veränderung des Lichtstrahls, der durch ein histologisches Hirnschnittpräparat durchtritt. Auf diese Weise kann die Faserrichtung und –neigung in jedem Punkt der betrachteten Region berechnet werden (Axer et al. 2000, Axer et al. 2001, Larsen et al. 2007).

### 4.2.1 Physikalische Grundlagen der Polarisation

Licht ist der für das menschliche Auge sichtbare Teil von elektromagnetischer Strahlung. Es umfasst typischerweise ein Spektrum zwischen 330 und 780 nm Wellenlänge. Werden die Hüllelektronen eines Atoms in Schwingung versetzt, gelangen sie in einen angeregten Zustand und erreichen dabei ein höheres Energieniveau. Beim Rückfall auf ein niedrigeres Energieniveau, wird ein bestimmter Energiebetrag frei, der in Form einer Lichtwelle ausgestrahlt wird. Jeder Lichtstrahl breitet sich als Transversalwelle aus. Es gibt also eine oszillierende Schwingung, die sich in einer Ebene ausbreitet, welche orthogonal zur Ausbreitungsrichtung des Lichtstrahls gelegen ist. Charakteristische Kennzahlen einer sich ausbreitenden Schwingung sind Frequenz, Wellenlänge, und die Amplitude. Die Frequenz gibt an, wie oft eine Welle in einem bestimmten Zeitraum schwingt, beispielsweise zehnmal

pro Sekunde. Die typische Einheit ist Hertz (Hz). Lichtstrahlen haben Frequenzen zwischen 789 und 385 THz. Der reziproke Wert der Frequenz ist die Wellenlänge. Die Amplitude einer Welle charakterisiert den maximalen beziehungsweise minimalen Ausschlag der Schwingung (Meschede 1995).

Das Licht einer natürlichen Strahlungsquelle besteht in der Regel aus vielen verschiedenen Lichtstrahlen, die in unterschiedlichen Ebenen oszillieren. Dieses Licht wird als unpolarisierte Strahlung bezeichnet. Licht, dessen Strahlen alle in der gleichen Ebene schwingen, wird als polarisiertes Licht bezeichnet, wobei verschiedene Zustände der Polarisierung existieren (Meschede 1995).

Betrachtet man einen einzigen Lichtstrahl, würde sich diese elektromagnetische Welle im Vakuum mit einer Geschwindigkeit von 300.000 Kilometern pro Sekunde ausbreiten. Trifft sie aber auf Materie, werden die Hüllenelektronen des getroffenen Atoms durch das elektromagnetische Feld des Strahls in Schwingung versetzt, gehen in einen angeregten Zustand über und senden beim Rückfall auf ihr altes Energieniveau erneut Lichtwellen aus. Auf diese Weise breitet sich Licht beim Durchtritt durch Materie aus. Weil es aber ständig mit den Teilchen (vor allem Dipolen) interagiert, verringert sich die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Welle. Somit hängt die Fortpflanzungsgeschwindigkeit unter anderem von der Teilchendichte des Materials ab. Dieser Effekt wird durch den Brechungsindex quantifiziert. Dieser ist definiert als der Quotient aus Lichtgeschwindigkeit im Vakuum und Lichtgeschwindigkeit im Gewebe (Meschede 1995).

Typische Brechungsindizes im biologischen Gewebe sind 1,38 für Muskelgewebe (Haskell et al. 1989), 1,46 für unfixierte Nervenzellen (de Campos Vidal et al. 1980), 1,48 für Lipide oder 1,55 für Kollagen (Larsen et al. 2007).

Durchdringt ein polarisierter Lichtstrahl isotropes Material, ist der Brechungsindex unabhängig von der Ausbreitungsrichtung und der Einfallsnäigung. Isotropie bedeutet, dass Stoffe in jeder Richtung gleich bleibende physikalische Eigenschaften besitzen (Meschede 1995). Wenn ein Medium anisotrope Eigenschaften besitzt, wird sich der Brechungsindex des Lichtstrahls abhängig von Polarisationsgrad und Ausbreitungsrichtung verändern. Dabei beeinflusst die Orientierung von Strukturen im anisotropen Medium den Polarisationsgrad des durchtretenden Lichtstrahls. Diese Eigenschaft wird als Doppelbrechung bezeichnet und bildet die entscheidende Grundlage für die Methode des Polarized Light Imaging (Larsen et al. 2007).

#### 4.2.2 Verschiedene Zustände der Polarisation

Bei allen Vorüberlegungen wurde bisher von nur einem Lichtstrahl ausgegangen. Um das Polarized Light Imaging zu verstehen, müssen im Weiteren zwei Lichtstrahlen betrachtet werden. Der Hintergrund dieser Überlegung besteht darin, dass jeder Lichtstrahl als Summe aus zwei einzelnen Strahlen mit gleicher Ausbreitungsrichtung dargestellt werden kann. Einer dieser Strahlen oszilliert in einer Ebene, die orthogonal zur Ausbreitungsrichtung ist. Der andere schwingt in einer zweiten Ebene, die senkrecht zur ersten Ebene gelegen ist (Horizontal- und Transversalebene). Schwingen die beiden Strahlen in der gleichen Frequenz und Amplitude, so dass Wellenberge der horizontalen Welle auf Wellenberge der transversalen Welle treffen, resultiert eine diagonale Schwingung, die im Winkel von 45 Grad zu den beiden Ebenen liegt. Durch die Summation der Amplituden beider Wellen, die mit gleicher Frequenz und ohne Phasendifferenz schwingen, lässt sich jeder Lichtstrahl zwischen 0 und 90 Grad darstellen. Dieses Licht wird als linear polarisiert bezeichnet. Der Lichtvektor ( $F$ ) beschreibt eine Gerade in einer Ebene, die senkrecht zur Ausbreitungsrichtung ist.

Besteht zwischen der horizontalen Welle und der transversalen Welle eine Phasendifferenz, welche als Gangunterschied bezeichnet wird, entsteht zirkulär beziehungsweise elliptisch polarisiertes Licht. Für zirkulär polarisiertes Licht muss die horizontale Welle um eine viertel Wellenlänge gegenüber der transversalen Welle verschoben sein. In diesem Fall fällt ein Wellenberg der horizontalen Schwingung mit einem Nullpunkt der transversalen Schwingung zusammen. Liegt ein Gangunterschied von mehr oder weniger als einer viertel Wellenlänge vor, entsteht elliptisch polarisiertes Licht. Dabei gibt es eine schnelle Achse, in der sich das Licht mit höherer Geschwindigkeit ausbreitet, und eine langsame Achse mit geringerer Ausbreitungsgeschwindigkeit. Das heißt, der Lichtvektor ( $F$ ) schwingt in einer zur Ausbreitungsrichtung der Lichtwelle senkrechten Ebene, die sich mit gleicher Winkelgeschwindigkeit dreht. (Meschede 1995; Larsen et al. 2007)

Doppelbrechende Medien haben die Eigenschaft, dass horizontale und transversale Welle in unterschiedlichem Maße beeinflusst werden. Zirkulär polarisiertes Licht, dessen Lichtvektor einen Kreis beschreibt, wird somit beim Durchtritt durch ein doppelbrechendes Medium in elliptisch polarisiertes Licht umgewandelt. Die

Durchtrittsintensität des Lichtes durch einen Analysator kann gemessen werden und lässt Rückschlüsse auf die Doppelbrechung der Strukturen des Gewebes zu.

Um zirkulär polarisiertes Licht durch ein Medium senden zu können, muss es zunächst erzeugt werden. Hierfür bedient man sich einer Viertelwellenplatte. Dabei handelt es sich um ein optisches Bauteil, welches aus einem doppelbrechenden Material, wie zum Beispiel Quarzkristall, aufgebaut ist. Der Unterschied in den Brechzahlen ist genau so groß gewählt, dass die horizontal polarisierte Welle gegenüber der vertikal polarisierten Welle um eine viertel Wellenlänge verzögert wird (Meschede 1995; Larsen et al. 2007). Dies hat zur Folge, dass linear polarisiertes Licht beim Durchtritt durch die Viertelwellenplatte in zirkulär polarisiertes Licht umgewandelt wird. Im Weiteren sollen die Doppelbrechung, grundlegende Prinzipien und die Funktionsweise des Polarized Light Imaging vorgestellt werden.

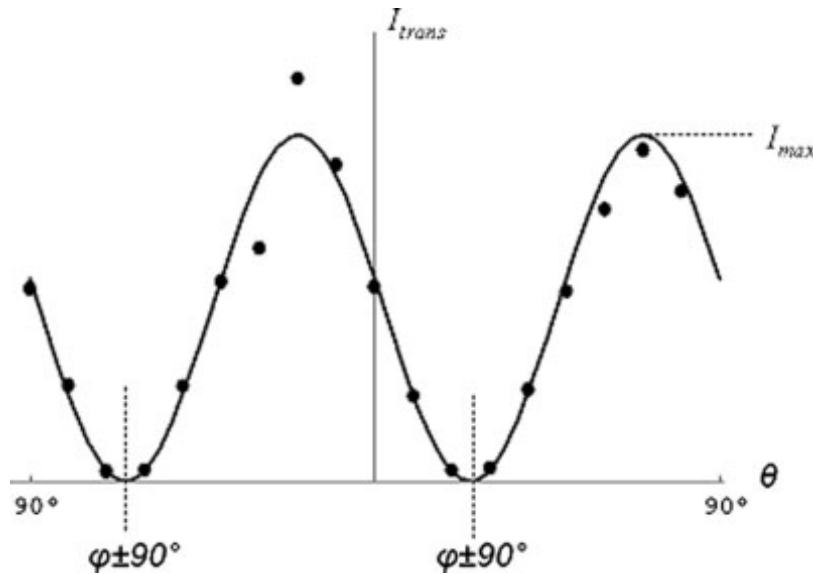
#### 4.2.3 Prinzip des Polarized Light Imaging

Die Verwendung von polarisiertem Licht ist seit fast einem Jahrhundert bekannt. Sie diente damals der Darstellung von biologischen Proben (Scheuner und Hutschenreiter 1972) und eignete sich besonders zur Visualisierung von Nervenfasern (Göthlin 1913). In der vorliegenden Dissertation und vorherigen Arbeiten wurde polarisiertes Licht verwendet, um den Nervenfaserverlauf in der weißen Substanz des Gehirns und deren Orientierung darzustellen. Unter Verwendung gekreuzter Polarisatoren und einer Viertelwellenplatte kann die Richtung (xy-Ebene) und Steigung beziehungsweise Neigung (über die Schnittdicke in z-Richtung) der Nervenfasern in seriellen Gehirnschnitten visualisiert werden (Axe et al. 2000, Axe et al. 2001, Axe und Keyserlingk 2000).

Die einfachste Anordnung für das Polarized Light Imaging besteht in der Verwendung von zwei Polarisatoren, die statisch angeordnet sind und in einem Winkel von  $90^\circ$  zueinander stehen (Static-Crossed-Polars). Vor dem ersten Polarisator liegt die Lichtquelle, dazwischen das Dünnschnittpräparat und hinter dem zweiten Polarisator eine Kamera zur Detektion der transmittierten Lichtintensität. Ein Polarisator ist ein optisches Bauteil, welches nur Licht einer bestimmten Schwingungsebene passieren lässt. Lichtstrahlen, deren Schwingungsebene parallel zur Polarisationssebene des Polarisators liegen, können durchtreten. Alle anderen

Lichtstrahlen werden absorbiert oder reflektiert. Das unpolarisierte Licht der Strahlungsquelle gelangt durch den Polarisator und wird in linear polarisiertes Licht umgewandelt, welches die Probe durchstrahlt. Ist das Präparat nicht doppelbrechend, wird das polarisierte Licht seinen Polarisationsgrad nicht verändern und trifft auf den zweiten Polarisator. Dieser wird auch als Analysator bezeichnet und ist gegenüber dem Polarisator um  $90^\circ$  verdreht, sodass kein Lichtstrahl passieren kann. Besitzt das untersuchte Gewebe doppelbrechende Eigenschaften, wird ein Teil des polarisierten Lichtes im Polarisationsgrad verändert und ist in der Lage den Analysator zu passieren. Das heißt das linear polarisierte Licht wird in elliptisch polarisiertes Licht umgewandelt. Die Transmissionsintensität des Lichtes kann durch die in der Literatur angegebene modifizierte Fresnel-Formel (Schneuner und Hutschenreiter 1972) berechnet werden.

Um quantitative Aussagen zur Doppelbrechung eines Gewebes machen zu können, bedarf es einer im Folgenden beschriebenen Erweiterung der Versuchsanordnung. Beim Rotating-Crossed-Polars-Verfahren wird der Analysator gegenüber dem Polarisator in seiner Ausrichtung verdreht, sodass sich die Transmissionsintensität sinusoidal verändert. Durch die Doppelbrechung der Probe entsteht Licht, dass in zwei Ebenen schwingt, die zueinander senkrecht stehen. Dadurch gibt es also vier Positionen des Analysators, in denen eine minimale beziehungsweise maximale Transmissionsintensität besteht. Das sind die fiktiven Achsen von  $0^\circ/180^\circ$ ,  $90^\circ/270^\circ$ ,  $180^\circ/0^\circ$  und  $270^\circ/90^\circ$ . Aus diesem Grund lassen sich nur doppeldeutige Rückschlüsse auf den Faserverlauf der doppelbrechenden Struktur ziehen, also  $\pm 90^\circ$  (Larsen et al. 2007), (*Abbildung 12*).

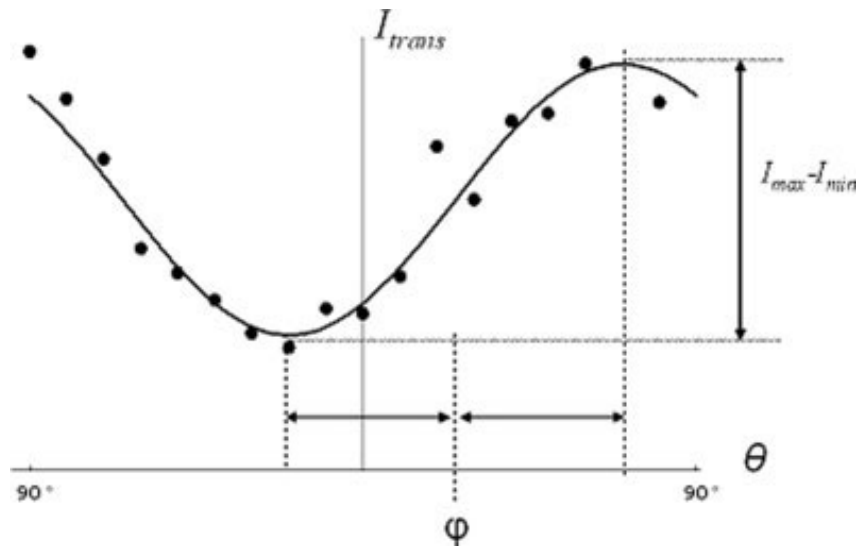


*Abbildung 12:* Sinusfunktion der Lichtintensität unter Verwendung gekreuzter Polarisatoren. Maximale Intensität: Transmissionsachse des Polarisators deckungsgleich mit der Faser. Minimale Intensität: Fasern verlaufen  $45^\circ$  zur Transmissionsachse. (Larsen et al. 2007)

Durch die Sinusform der Lichtintensität kann die Steigung der Nervenfasern ermittelt werden. Das Maximum der Lichtintensität verändert sich abhängig von der Faserneigung. Das Transmissionsmaximum wird außerdem von der Schnittdicke des Präparats beeinflusst. In der vorliegenden Untersuchung wählten wir für die Präparate eine Schnittdicke von  $100\mu\text{m}$ , da sich diese in Voruntersuchungen als optimales Maß darstellte (Axer et al. 2001, Larsen et al. 2007).

Die bereits erwähnte Doppeldeutigkeit, welche beim Rotating-Crossed-Polars-Aufbau entsteht, kann durch die Verwendung einer Viertelwellenplatte beseitigt werden. Dieses optische Element wandelt das linear polarisierte Licht des Polarisators in zirkulär polarisiertes Licht um. Dabei ist die Horizontalwelle gegenüber der Transversalwelle um eine Viertelwellenlänge oder  $\pi/2$  versetzt (*Abbildung 13*). Wenn zirkulär polarisiertes Licht doppelbrechende Strukturen passiert, werden Horizontal- und Transversalwelle unterschiedlich beeinflusst und es entsteht elliptisch polarisiertes Licht, welches auf den Analysator trifft. Liegt die lange Achse der Viertelwellenplatte parallel zur Polarisationssebene der doppelbrechenden Struktur wird hinter dem Analysator die stärkste Transmissionsintensität messbar sein. Auf diese Weise werden verschiedene Daten der gleichen Probe mit unterschiedlichen Polarisationsseinstellungen gesammelt und daraus über eine Anpassung an die

Sinusfunktion die Berechnung der Faserorientierung im Präparat ermöglicht. Da sowohl das doppelbrechende Gewebe als auch die Viertelwellenplatte, den Polarisationsgrad der Lichtwelle beeinflussen, spielt es keine Rolle, ob die Viertelwellenplatte vor oder hinter dem Präparat angebracht ist.



*Abbildung 13:* Sinusfunktion der Lichtintensität unter Verwendung gekreuzter Polarisatoren mit Viertelwellenplatte. Maximale Lichtintensität: die Achse der Viertelwellenplatte ist mit den Fasern des Präparates deckungsgleich. Minimale Lichtintensität: bei senkrechter der Faseranordnung. (Larsen et al. 2007)

#### 4.2.4 Aufbau und Handhabung der Polarisationsapparatur

Die verwendete Polarisationsapparatur besteht aus einer Lichtquelle, zwei gekreuzten Polarisatoren, einer Viertelwellenplatte, einer Kamera und einer Bildverarbeitungseinheit.

Die Lichtquelle besteht aus fünf parallel angeordneten Leuchtstoffröhren der Firma Osram GmbH München (13 W, Durchmesser 16 mm, Lichtfarbe 25 Universal-Weiß). Darüber befinden sich zwei gekreuzte Polarisatoren (Polarisationsfolien der Firma B+W Filter, Schneider, Bad Kreuznach), eine schwenkbare Viertelwellenplatte und der Objektträgertisch mit dem jeweiligen Präparat. Zur Aufnahme der Bildsequenzen dient die Digitalkamera CCD Axiocam HR (Carl Zeiss Göttingen, Grundauflösung 1388 x 1040 Pixel) sowie ein PC mit dem Betriebssystem Microsoft Windows (*Abbildung 14 und Abbildung 15*).

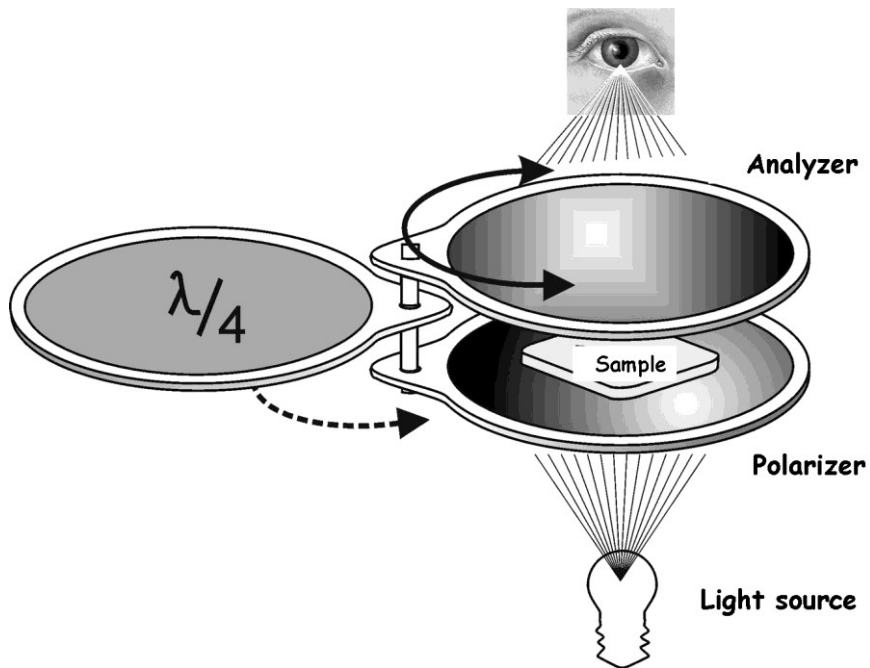


Abbildung 14: Prinzip und Anordnung der Polarisationsapparatur (Axer et al. 2001)

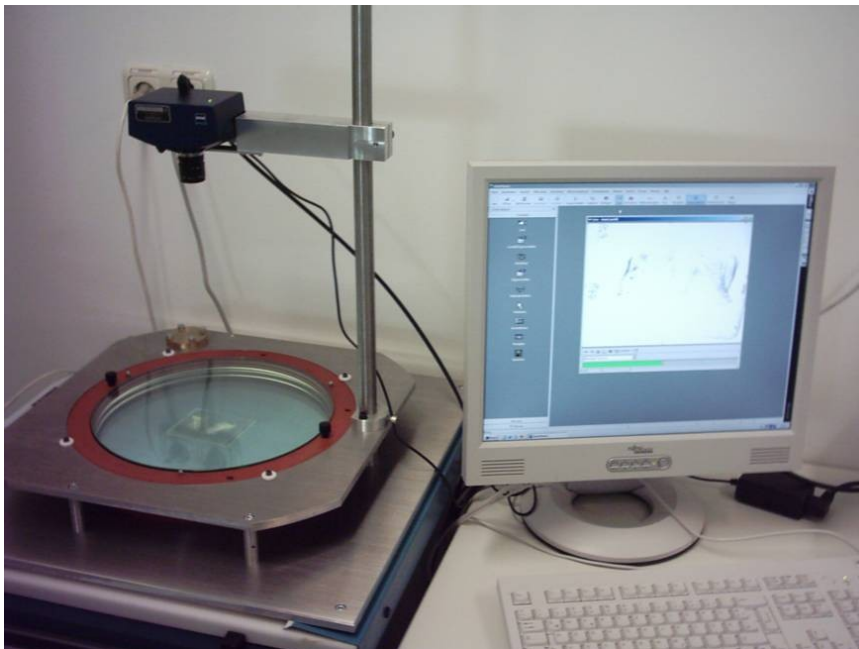


Abbildung 15: Arbeitsplatz: PLI mit Bildverarbeitungseinheit



Durch die gewählte Auflösung der verwendeten Digitalkamera und dem Abstand zum Präparat entspricht ein Pixel des digitalen Bildes einer Fläche von  $64\mu\text{m} \times 64\mu\text{m}$  im histologischen Schnitt. Abbildung 15 zeigt die nach unten gerichtete Kamera, den Aufbau der drehbaren Rotationsfilter und das auf dem Objektträger fixierte Hirnschnittpräparat (*Abbildung 15*).

Die histologischen Schnitte werden von Hand in jeweils gleicher Ausrichtung auf dem herausklappbaren Objekthalter platziert und bleiben bei der Messung an diesem Ort fixiert. Mit Hilfe kleiner Metallstifte werden die Viertelwellenplatte und die rotierbaren Filter miteinander arretiert und damit die Polarisatoren senkrecht zueinander angeordnet. Zu Beginn der Messung wird der Röntgenshirm mit der niedrigsten Helligkeitsstufe betrieben. Es erfolgt der erste Teil der Messung in  $20^\circ$  Schritten unter Drehwinkeln von  $160^\circ$  bis  $0^\circ$ . Jeder einzelne Drehwinkel wird manuell eingerichtet und anschließend arretiert. Nach dem Entfernen der Metallstifte wird nun die Viertelwellenplatte herausgeklappt und der Röntgenshirm auf die größte Helligkeitsstufe eingestellt. Das Präparat verbleibt in unveränderter Position und unter manueller Ausrichtung der Drehwinkel von  $0^\circ$  bis  $80^\circ$  erfolgt der zweite Teil der Messung in  $10^\circ$ -Schritten.

Für jeden Gehirnschnitt werden somit neun Bilder in  $10^\circ$ -Rotationsschritten mit zwei senkrecht angeordneten Polarisationsfiltern und neun Bilder in  $20^\circ$ -Rotationsschritten mit zwei Filtern unter Verwendung einer zusätzlichen Viertelwellenplatte angefertigt. Folglich entstehen pro Präparat 18, von Hand erstellte, digitale Bilder, welche mit Hilfe der Bildverarbeitungssoftware AxioVision (Carl Zeiss, Göttingen) benannt und archiviert werden. Die Archivierung erfolgt in Form von unkomprimierten Bitmap-Dateien.

Um systematische Fehler im Messaufbau zu detektieren und gegebenenfalls auszugleichen erfolgt die Kalibrierung mittels eines definiert geschnittenen Nervus opticus.

#### 4.2.5 Analyse der Polarisationssequenzen

Für die neun Intensitätswerte in jedem Pixel wurden Sinusfunktionen berechnet um die Winkel der Faserrichtung (Orientierung innerhalb der Ebene) und Neigungswinkel (Orientierung außerhalb der Ebene) zu rekonstruieren.

Durch die Messung mit zwei gekreuzten Polarisatoren in  $10^\circ$ -Rotationsschritten lässt sich die Faserneigung von  $0^\circ$  bis  $90^\circ$  im Querschnitt (z-Richtung) des Gehirnschnittes ermitteln. Für jeden Grauwert dieser neun Aufnahmen wird die Sinusfunktion für jeden Pixel angepasst (MATLAB 7.7.0: MathWorks Inc., Natick, MA, USA). Durch diesen MATLAB-Algorithmus ist es möglich, den hellsten Grauwert der Sinusfunktion zu ermitteln und diesem einen definierten Neigungswinkel zuzuweisen. Das wird durch die Kalibrierung an einem definiert geschnittenem Nervus opticus möglich.

In der Messung unter Verwendung der Viertelwellenplatte werden in  $20^\circ$ -Rotationsschritten ebenfalls neun digitale Bilder erzeugt. Somit werden die verschiedenen Grauwerte in der Schnittebene des Präparats (xy-Richtung) von  $0^\circ$  bis  $180^\circ$  ermittelt und mit Hilfe des MATLAB-Algorithmus die Faserrichtung berechnet. Auch in diesem Fall muss die verwendete Sinusfunktion für jeden Pixel angepasst werden. Die Faserrichtung entspricht dabei dem Winkel mit dem niedrigsten Grauwert (*Abbildung 16*).

Zur Berechnung eines dreidimensionalen Datensatzes könnten die erstellten Einzeldatensätze der Faserorientierungskarten aneinander ausgerichtet und zu einem Datensatz zusammengeführt werden. Hierfür würden die seriell aufeinander folgenden Gehirnschnitte gegeneinander verschoben werden, das heißt, es erfolgte die Verschiebung in x- und y-Richtung sowie eine Rotation. Als Kriterium für die optimale Anpassung muss die Euklidische Distanz gewählt werden (Fit-Kriterium). Die Euklidische Distanz hat sich aufgrund der gegenüber anderen Kriterien geringsten Fehler- beziehungsweise Abweichungsquote für die Datenrekonstruktion als am günstigsten erwiesen (Axe et al. 2002). Eine dreidimensionale Rekonstruktion wäre anschließend durch die Bearbeitung der digitalen Daten mittels MATLAB-Algorithmen und mit Hilfe des 3D-Slicer (Free Open Source Software, Massachusetts Institute of Technology, USA) möglich.

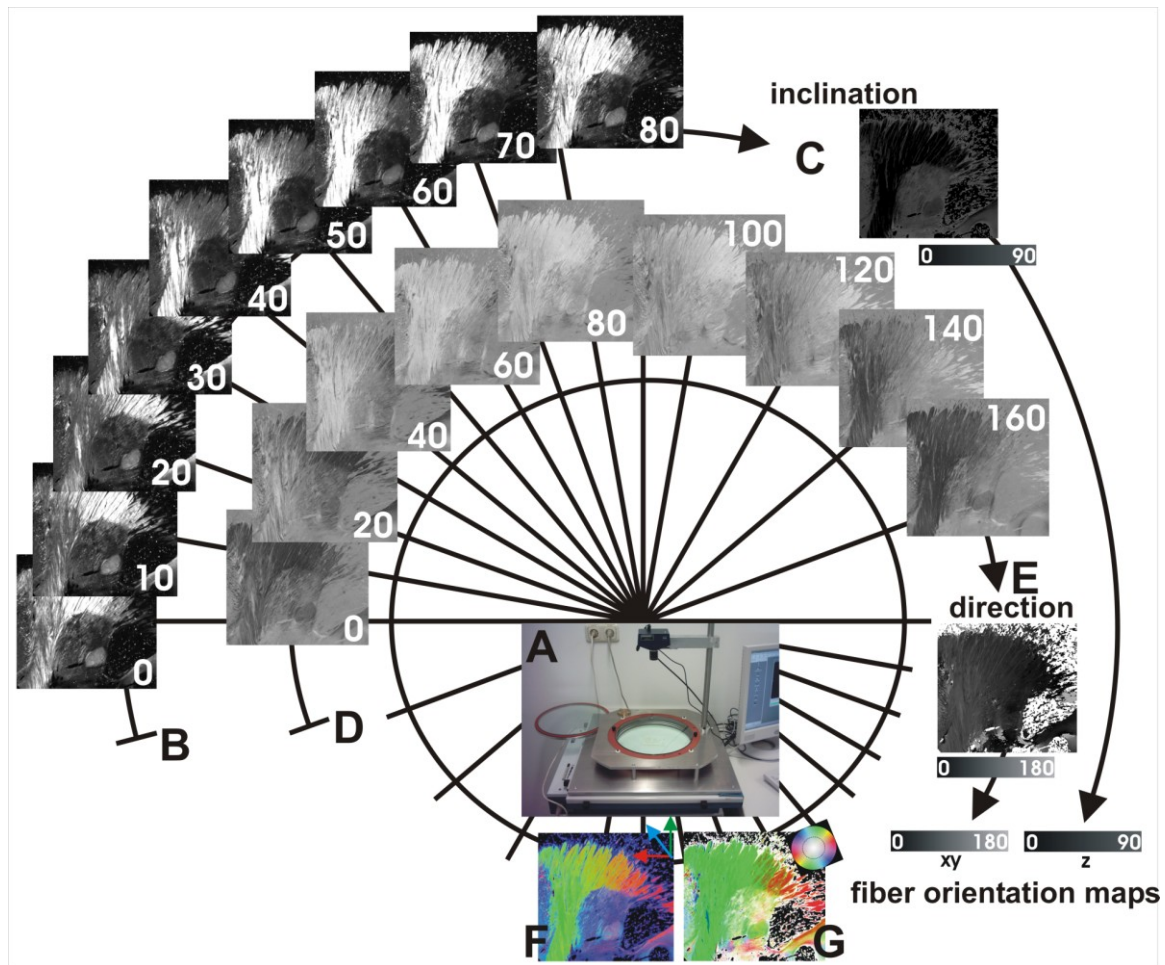


Abbildung 16: Erstellung und Berechnung der Bilder

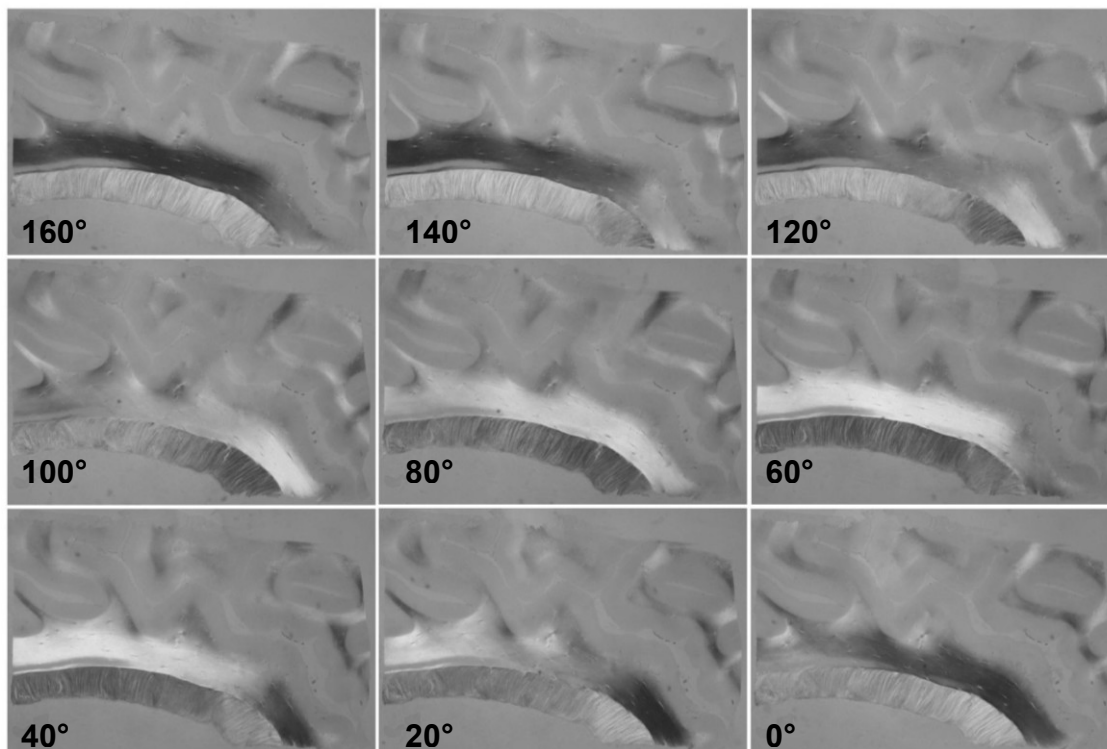
- A: Polarisationsapparatur mit zwei rotierbaren gegenläufig angeordneten Polarisatoren und einer einschwenkbaren Viertelwellenplatte
- B: Neun, für jedes Präparat angefertigte, Bilder in 10°-Rotationsschritten unter Verwendung von zwei gekreuzten Polarisatoren
- C: Berechnete Faserneigungswinkel (aus B)
- D: Neun Bilder in 20°-Rotationsschritten unter Verwendung einer zusätzlichen Viertelwellenplatte
- E: Berechnete Faserrichtungswinkel (aus D)
- F und G: Verschiedene Faserorientierungskarten mit unterschiedlichen Farbschemata. (Axer H et al 2011)

## 5 Ergebnisse

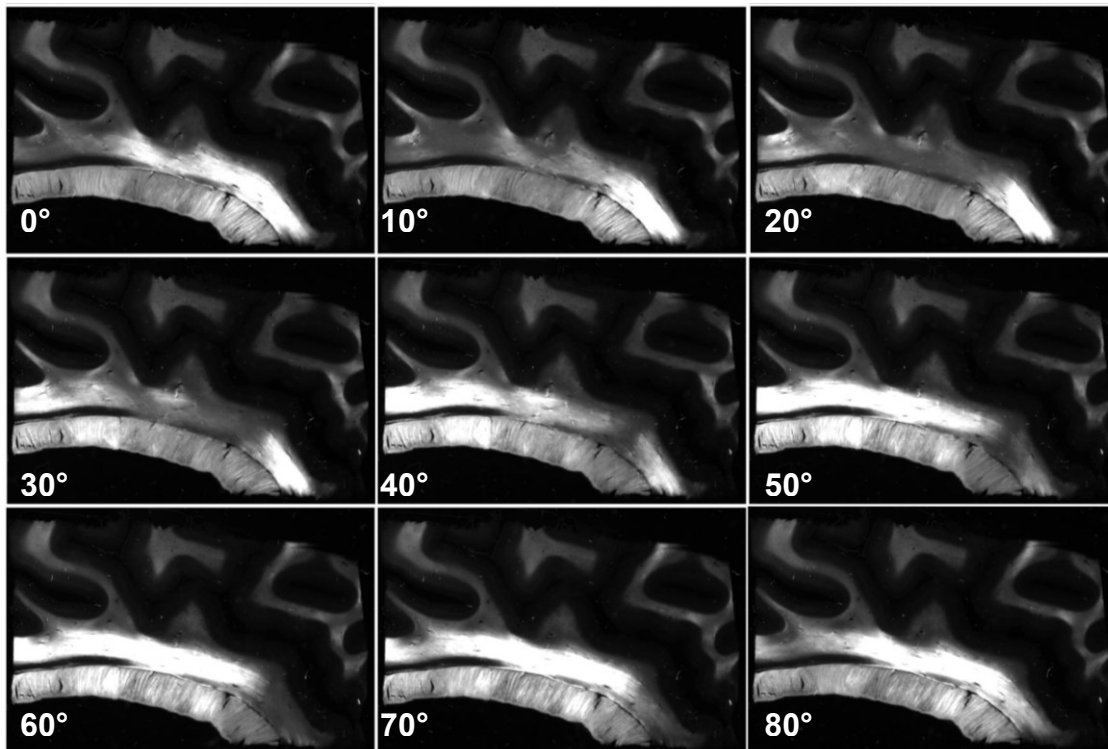
### 5.1 Digitalisierung

Das anteriore Cingulum beider Hemisphären der sechs menschlichen Gehirne wurde in 100 µm dicke Präparate seriell geschnitten. Daraus resultierten pro Gehirn 800 bis 1000 Schnitte und insgesamt zirka 6000 Präparate. Von jedem Präparat wurden eigens 18 Bilder mittels Polarisationsoptik und dem Bildverarbeitungsprogramm AxioVision digitalisiert. Es wurden je neun Bilder mit gekreuzten Polarisatoren in 20°-Schritten unter Drehwinkeln von 160° bis 0° und je neun Bilder unter Verwendung einer zusätzlichen Viertelwellenplatte (10°-Schritte mit Drehwinkeln von 0° bis 80°) erstellt. Somit ergeben sich über 85.000 Einzeldatensätze.

Abbildungen 17a und 17b zeigen eine Beispielsequenz eines Präparates, wie sie für jeden einzelnen seriellen Hirnschnitt per Hand angefertigt wurde (*Abbildung 17a und 17b*). Die digitalen Bilder wurden unter manueller Sichtung von 1 bis 18 durchnummeriert, nach dem dazugehörigen Gehirn benannt und anschließend archiviert.



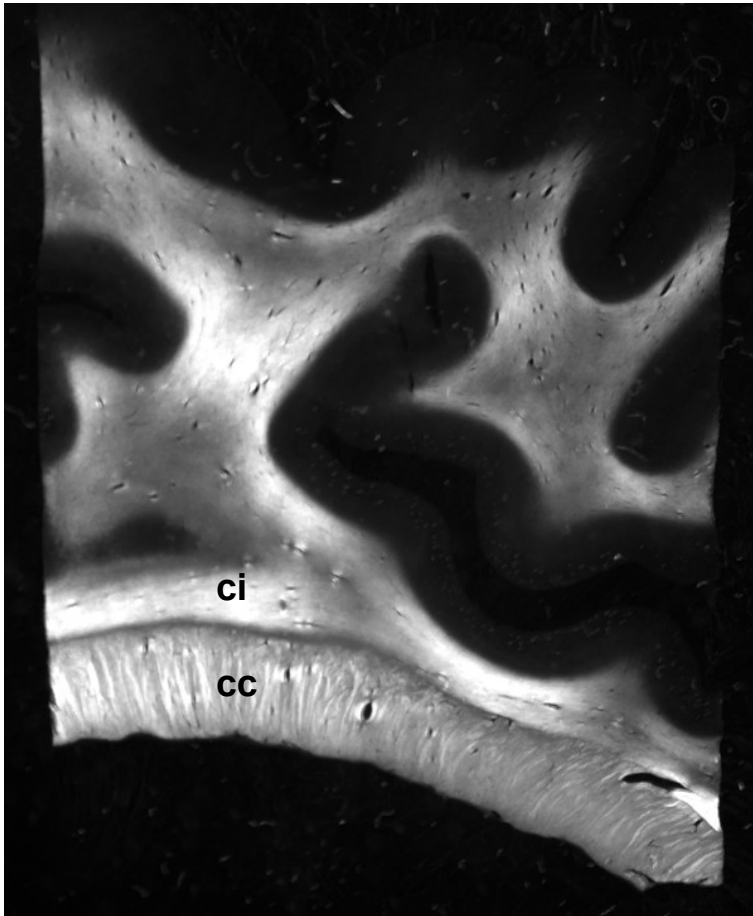
*Abbildung 17a:* Bildsequenz eines Dünnschnittpräparates des supracallosalen anterioren Cingulum unter Verwendung gekreuzter Polarisatoren



*Abbildung 17b:* Bildsequenz eines Dünnschnittpräparates des supracallosalen anterioren Cingulum unter zusätzlicher Verwendung der Viertelwellenplatte

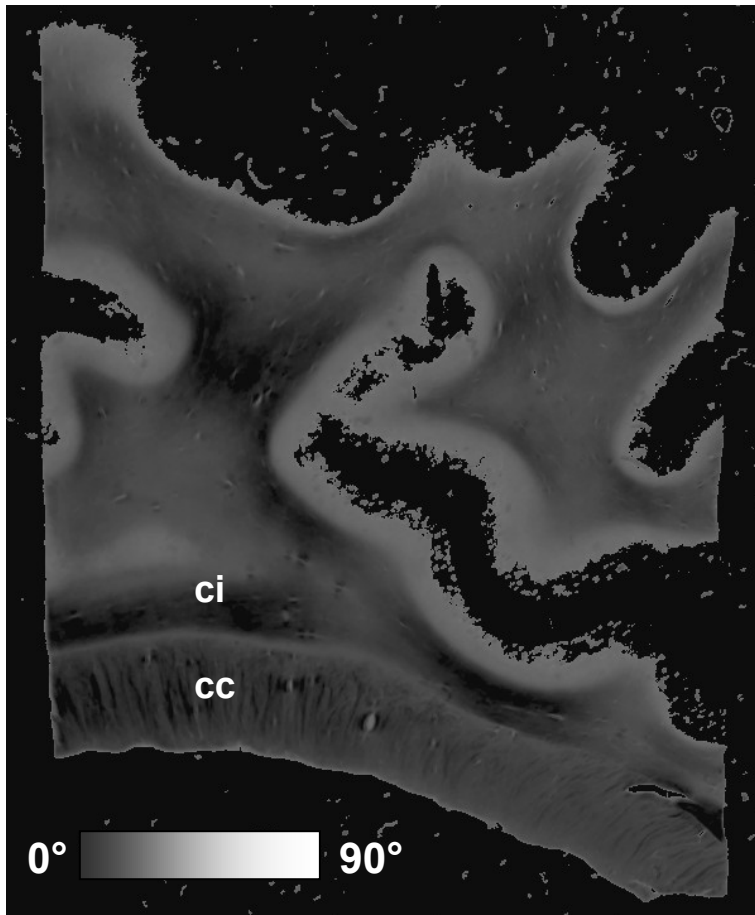
## 5.2 Faserorientierungskarten

Für die verschiedenen Drehwinkel der Polarisatoren ( $160^\circ$  bis  $0^\circ$  und  $0^\circ$  bis  $80^\circ$ ) erfolgte die Berechnung der einzelnen Grauwerte für jeden Pixel der digitalisierten Cingulumschnitte. Bei der Messung mit gekreuzten Polarisatoren (*Abbildung 17a*) verändern sich die gemessenen Grauwerte sinusoidal abhängig von der Polarisations-einstellung. Somit gibt es für jede eingestellte Gradzahl und jeden Azimuth einen bestimmten Grauwert, der durch die Faserneigung und -richtung bedingt ist. Durch die oben beschriebene sinusoidale Abhängigkeit kann für die gemessenen Grauwerte mittels MATLAB-Algorithmus eine Grenzwertbestimmung durchgeführt werden, wodurch im Weiteren die Maxima und Minima der Lichtintensität bestimmt werden. Aus diesen Daten werden Minimum- und Maximum-Intensitätskarten für jedes Präparat erstellt. Da die Maximum-Intensitätskarten einen starken anatomischen Kontrast erzeugen, werden sie als Grundlage für die Berechnung der Faserneigung verwendet. In *Abbildung 18* ist eine Maximum-Intensitätskarte des anterioren Cingulum exemplarisch dargestellt (*Abbildung 18*).



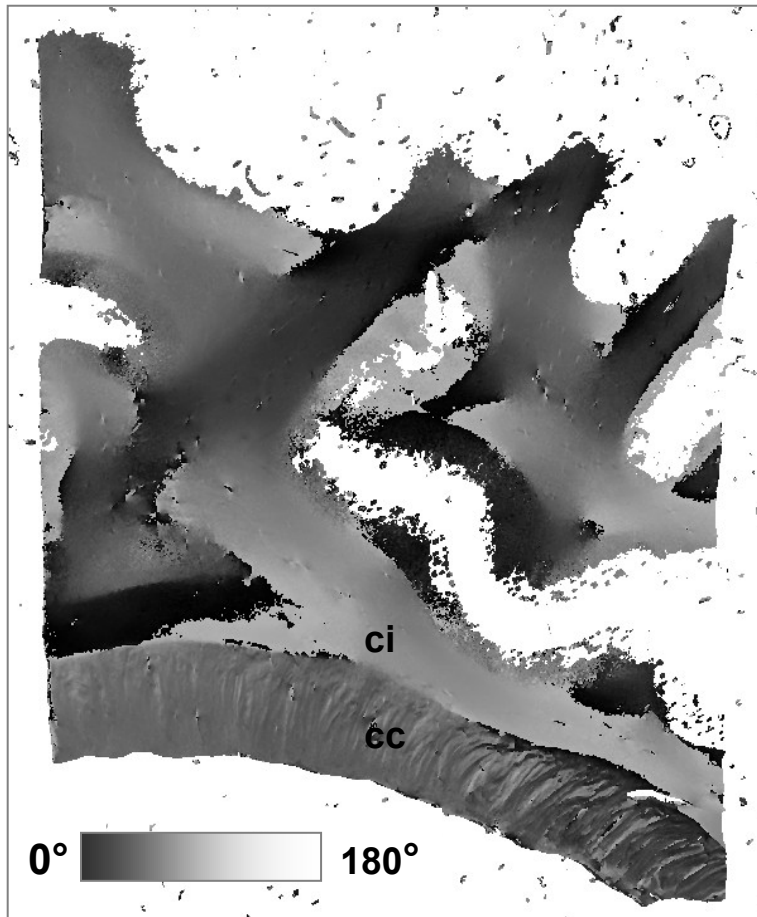
*Abbildung 18:* Maximum-Intensitätskarte eines supracallosalen Cingulumschnittes  
ci: Cingulum, cc: Corpus callosum

Anhand der Maximum-Intensitätskarten kann die Faserneigung in jedem Pixel des digitalisierten Dünnschnittpräparates als Funktion der Grauwert- und Neigungswinkel-Relation eines Gehirnschnittes berechnet werden. Die daraus resultierenden Neigungskarten bilden die Faserneigung von  $0^\circ$  bis  $90^\circ$  in z-Richtung des Gehirnschnittes ab (*Abbildung 19*).



*Abbildung 19:* Neigungskarte eines supracallosalen Cingulumschnittes  
ci: Cingulum, cc: Corpus callosum

Aus den oben beschriebenen Minimum-Intensitätskarten lassen sich Rückschlüsse auf die Faserrichtung im entsprechenden Präparat ziehen (x-y-Richtung). Da auch bei der Messung mit gekreuzten Polarisatoren unter Verwendung der Viertelwellenplatte eine sinusoidale Abhängigkeit der Grauwerte von der Polarisations-einstellung vorliegt, kann unter Anwendung des MATLAB-Algorithmus die Faserrichtung von 0° bis 180° ermittelt werden (*Abbildung 20*).

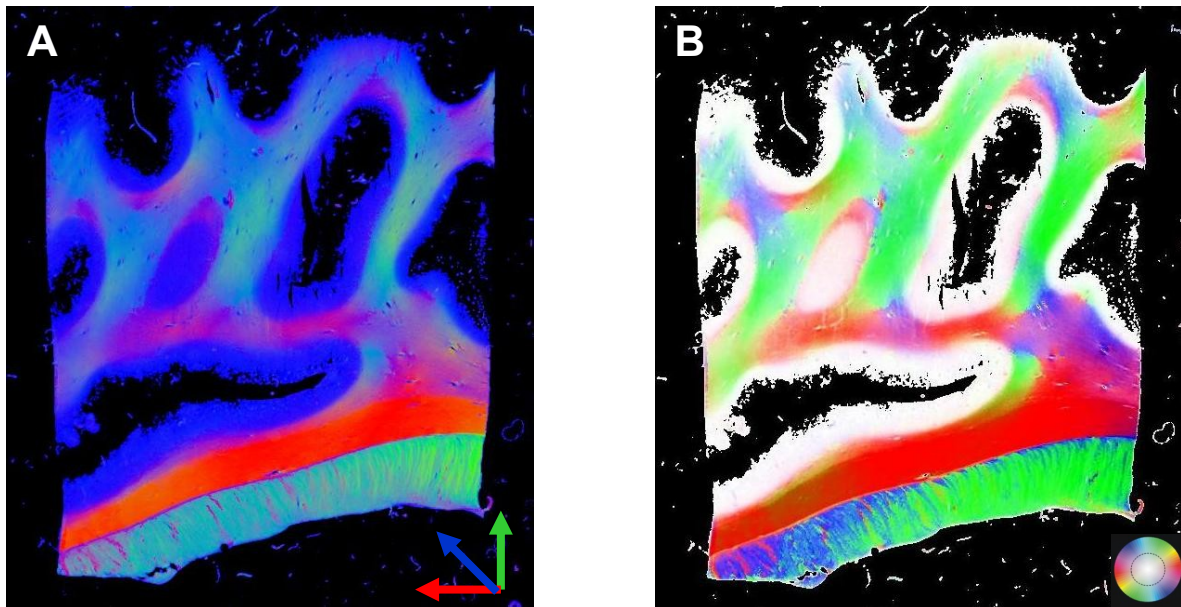


*Abbildung 20:* Richtungskarte eines supracallosalen Cingulumschnittes  
ci: Cingulum, cc: Corpus callosum

Die Informationen aus den Minimum- und Maximum-Intensitätskarten sowie den Faserneigungs- und Faserrichtungsdarstellungen können in farbig kodierten Faserorientierungskarten (FOM) zusammengeführt werden. Jedem Grauwert wird dabei eine Farbe des RGB-Farbenraumes (Rot-Grün-Blau) zugeordnet. Die Farben repräsentieren die verschiedenen Richtungen des Faserverlaufs, wobei verschiedene Farbschemata zur Anwendung kommen. Es gibt Darstellungen in denen Strukturen in roter Farbe den Faserverlauf in der Horizontale, Strukturen in grüner Farbe den Faserverlauf in der Vertikale und Strukturen in blauer Farbe den Faserverlauf in z-Richtung des Gehirnschnittes kodieren (*Abbildung 21a*). In der vorliegenden Arbeit wird die Faserorientierung mit Hilfe eines Farbkreises symbolisiert. Hierbei präsentiert die rote Farbe den horizontalen Verlauf, grüne oder gelbe Farbe den vertikalen Verlauf sowie blaue oder violette Farbe den diagonalen Verlauf in jeweils unterschiedlicher Ausrichtung (*Abbildung 21b*). Im Falle abweichender Anordnung

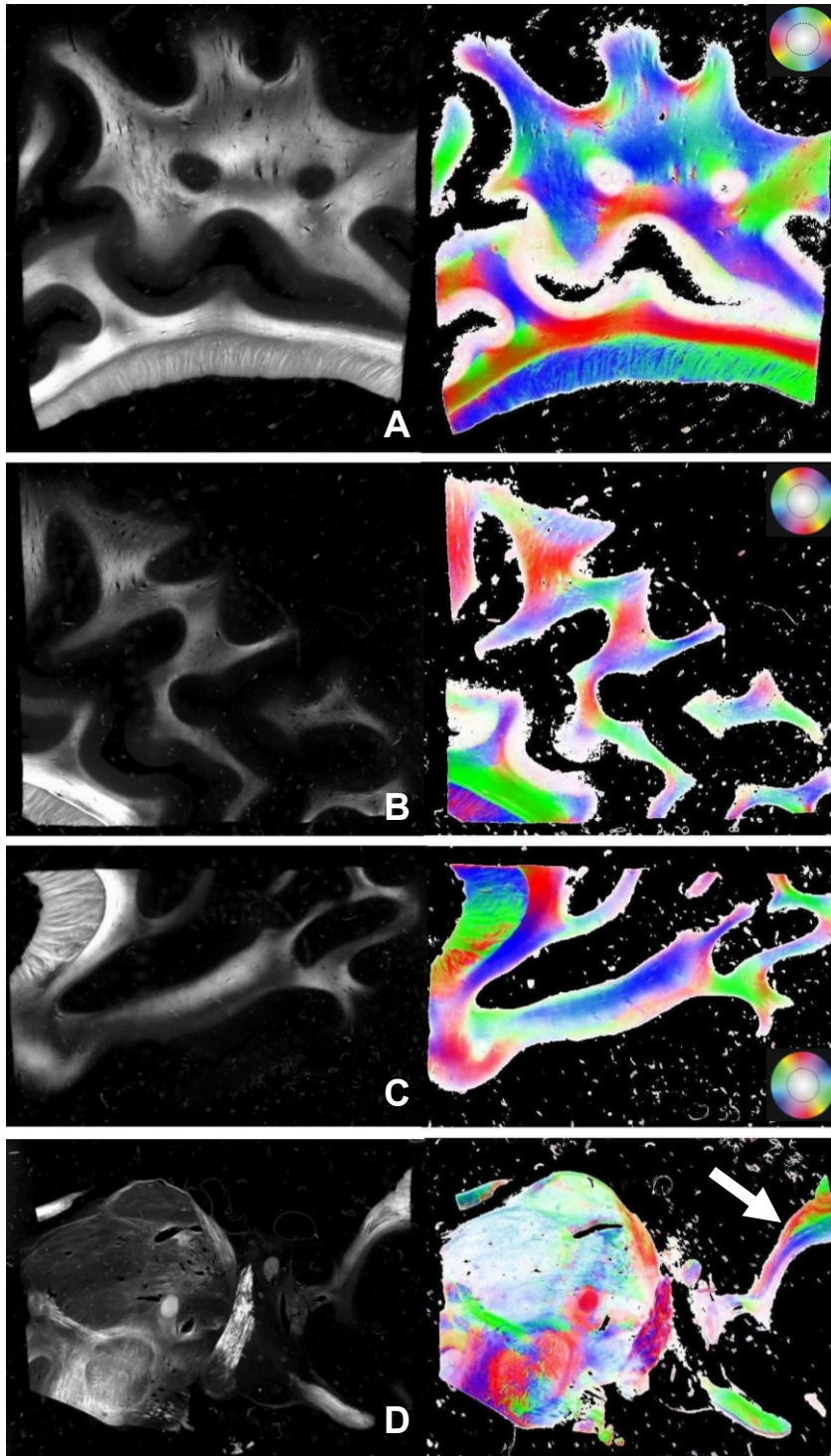


innerhalb der Polarisationsapparatur oder veränderter Datenbearbeitung der Gehirnschnitte wurde der jeweilige Farbkreis in den Abbildungen angepasst. Anhand der Faserorientierungskarten (FOM) wird die Orientierung der Fasern der weißen Substanz eines Dünnschnittpräparates dargestellt.



*Abbildung 21:* Faserorientierungskarte (FOM) eines supracallosalen Cingulumschnittes  
A und B: Visualisierung der Faserorientierung in verschiedenen Farbschemata

Für eine systematische anatomische Beschreibung wird das Cingulum im Folgenden topografisch in einen supracallosalen, prägenualen und subgenualen Teil unterschieden. Abbildung 22 stellt die Maximum-Intensitätskarten und Faserorientierungskarten der jeweiligen Abschnitte des Cingulum mit den angrenzenden Hirnregionen gegenüber (*Abbildung 22*).

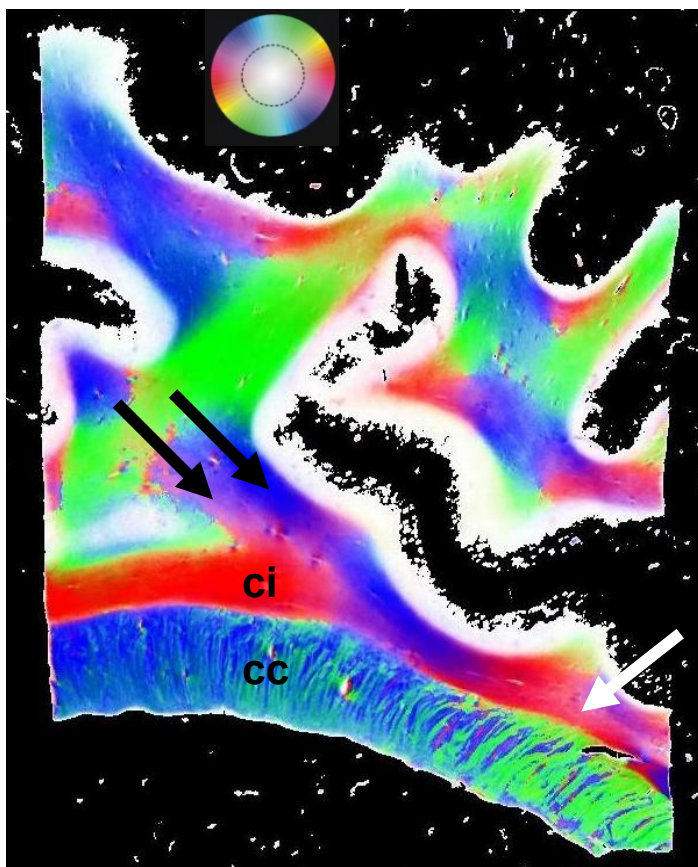


*Abbildung 22:* Maximum-Intensitätskarten und Faserorientierungskarten des anterioren Cingulum. A: supracallosaler Abschnitt, B und C: prägenualer Abschnitt, C und D: subgenualer Abschnitt (Pfeil)

### 5.2.1 Supracallosaler Abschnitt des anterioren Cingulum

Abbildung 23 zeigt die Faserorientierungskarte des supracallosalen Anteils des Cingulum der rechten Hemisphäre (*Abbildung 23*). Die anteriore Region stellt sich als

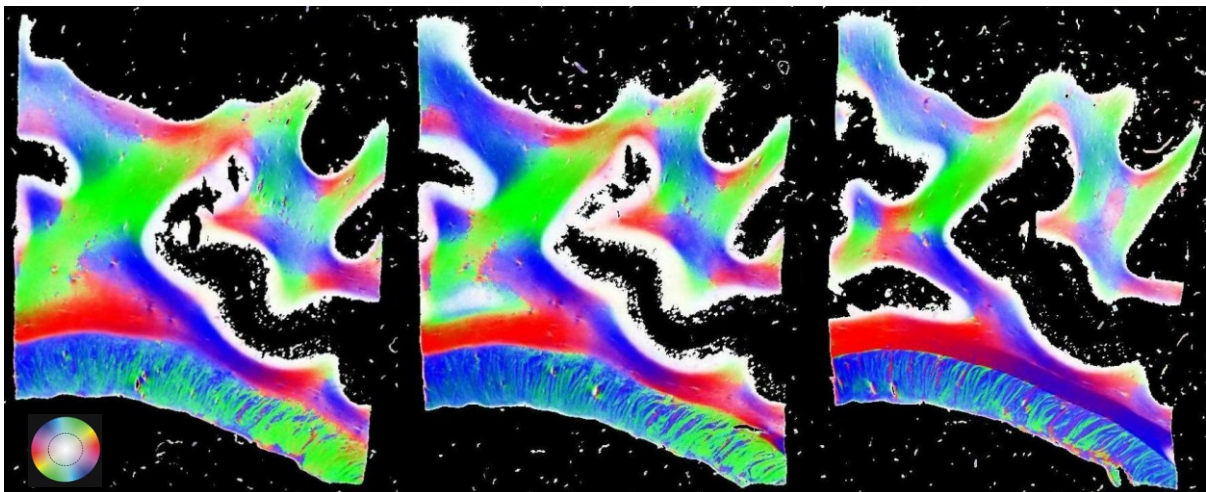
kompaktes Faserbündel dar (*Abbildung 23*, weißer Pfeil). Die Fasern liegen dem Corpus callosum an, grenzen sich aber deutlich von ihm ab, ohne sich miteinander zu vermischen. Die Fasern orientieren sich diagonal von kranial nach kaudal (blaue Farbe), gehen in einen horizontalen Verlauf über (rote Farbe) und ziehen weiter kaudal in Richtung Genu des Corpus callosum (violette Farbe). In diesen Verläufen zeigen sich keine aus- oder einstrahlenden Faserzüge anderer Hirnregionen. Im Gegensatz dazu weist das posteriore supracallosale Gebiet (midcinguläre Region) verschiedene Faservermischungen auf. Die rote Farbe repräsentiert den horizontalen Verlauf des cingulären Bündels entlang des Corpus callosum. Im Übergang zum anterioren supracallosalen Abschnitt zeigen sich diagonal einstrahlende Fasern aus angrenzenden Gebieten der weißen Substanz (*Abbildung 23*, schwarze Pfeile). Hierbei stellen sich Faservermischungen des midcingulären Bündels mit Faserzügen aus motorischen, prämotorischen und parietalen Kortexarealen dar. Auch im posterioren supracallosalen Cingulum zeigen sich keine Faserverläufe in das angrenzende Corpus callosum.



*Abbildung 23:* Faserorientierungskarte des supracallosalen Abschnittes des rechten anterioren Cingulum, ci: Cingulum, cc: Corpus callosum



Um Informationen über die räumliche Ausdehnung der Faserorientierung im supracallosalen Abschnitt des anterioren Cingulum zu gewinnen, sind im Folgenden drei Faserorientierungskarten von sagittalen Dünnschnittpräparaten dieser Region betrachtet worden (*Abbildung 24*). Die mittlere Abbildung entspricht dem oben beschriebenen Präparat (*Abbildung 23*), während das linke und rechte Bild jeweils 1mm medial beziehungsweise lateral davon liegen (10 Schnitte von jeweils 100µm Schnittdicke). In allen drei Abbildungen laufen die sich kreuzenden Faserzüge der benachbarten weißen Substanz (grüne und blaue Farbe) in Richtung des supracallosalen Cingulum, vermischen sich, und ziehen im Weiteren als einheitliche Struktur entlang des Balkens. Daraus ergibt sich, dass der oben beschriebene Verlauf des supracallosalen Cingulum nicht nur in einer Schnittebene vorhanden ist, sondern auch eine räumliche Ausdehnung aufweist.



*Abbildung 24:* Verlauf des rechten supracallosalen anterioren Cingulum

Im Vergleich zur rechten Hemisphäre zeigt auch die linke Hemisphäre (*Abbildung 25*) die bereits beschriebenen Faserorientierungen des supracallosalen Anteils des anterioren Cingulum. Die anteriore Region verläuft als kompaktes Faserbündel in annähernd horizontalem Verlauf (rote Farbe) entlang des Corpus callosum. Der posteriore Teil zeigt Einstrahlungen sowie Vermischungen von Faserzügen der angrenzenden kortikalen Areale. Somit zeigen sich keine wesentlichen Unterschiede der Faserorientierung des supracallosalen Cingulum von rechter und linker Hemisphäre.

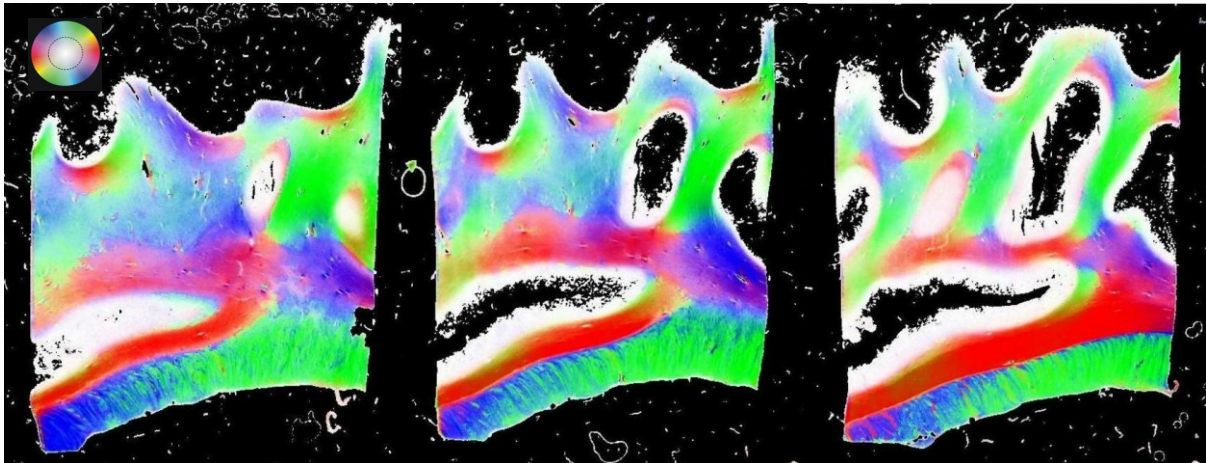


Abbildung 25: Supracallosaler Verlauf des anterioren Cingulum der linken Hemisphäre

### 5.2.2 Prägenualer Abschnitt des anterioren Cingulum

Das supracallosale cinguläre Bündel setzt sich nach rostral fort, verläuft entlang des Corpus callosum und wird hier als prägenualer Abschnitt bezeichnet. Abbildung 26 repräsentiert die Faserorientierung (A), Faserneigung (B) und –richtung (C) im prägenualen Cingulum (Abbildung 26). Das prägenuale Cingulum weist eine homogene Faserneigung entlang des Corpus callosum auf (Abbildung 26b). Anhand seiner Faserneigung lässt es sich nur schwer vom Corpus callosum abgrenzen. Auch die Faserrichtung des prägenualen cingulären Bündels erweist sich als gleichmäßig entlang des Balkens (Abbildung 26c). Im Balken ist der Wechsel der Faserrichtung deutlich erkennbar. Die Ergebnisse der homogenen Faserneigung und gleichmäßigen Faserrichtung spiegeln sich in der Faserorientierungskarte (Abbildung 26a) wider und lassen das prägenuale Cingulum als kompaktes Bündel erscheinen, welches entlang des Genu des Corpus callosum (Abbildung 26a, Pfeil) verläuft. Es zeigen sich keine Faserverbindungen zum Kortex oder callosalen Strukturen.

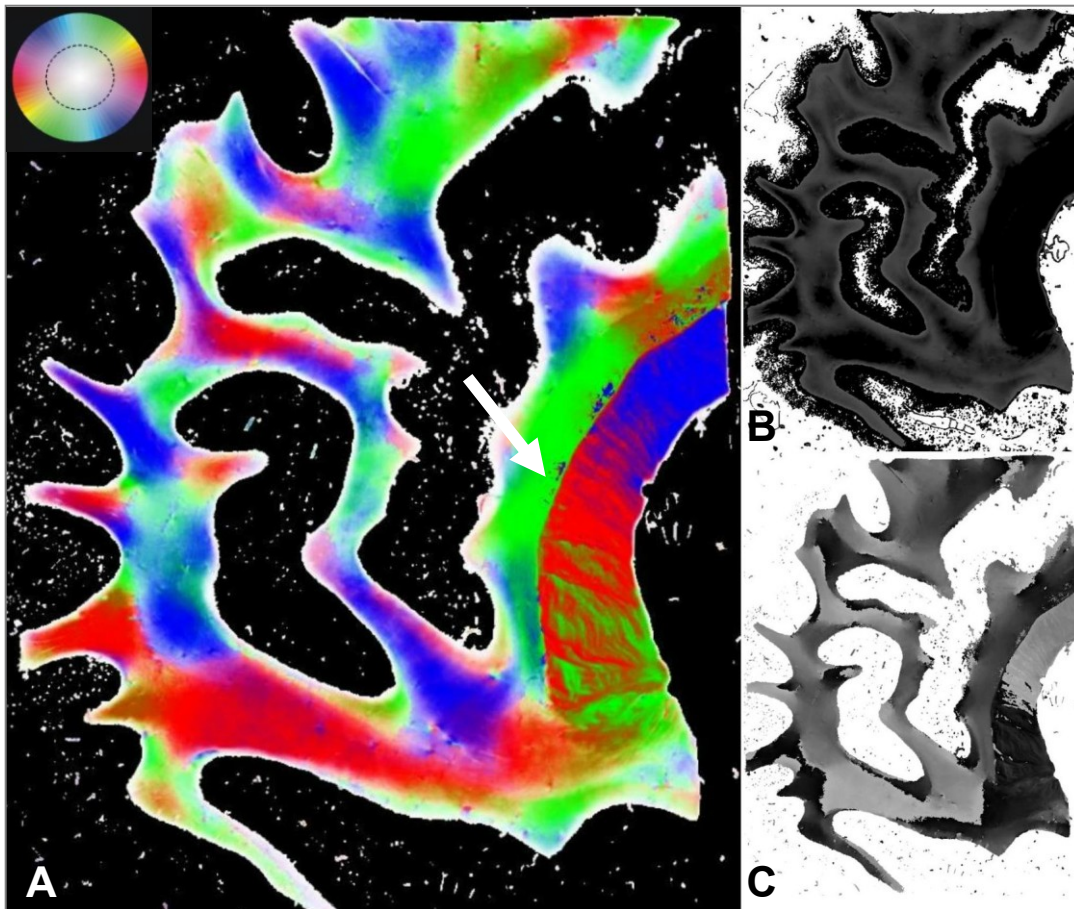
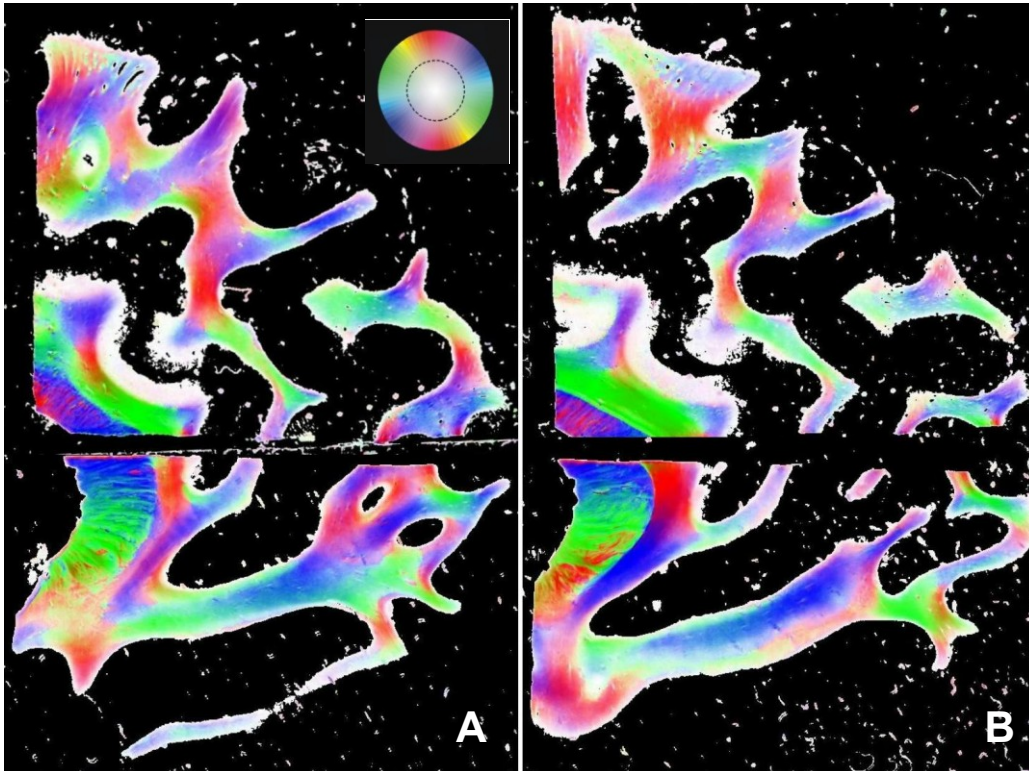


Abbildung 26: A: Faserorientierung des prägenualen Abschnittes des anterioren Cingulum der linken Hemisphäre, B: Faserneigungskarte, C: Faserrichtungskarte

Beim Vergleich der sagittalen Schnitte des prägenualen Cingulum der rechten Hemisphäre im Verlauf von medial nach lateral (Abbildung 27) zeigt sich in den Präparaten die oben beschriebene Orientierung. Die beiden exemplarisch gezeigten Abbildungen entsprechen einem Abstand von zirka 2 mm. Das prägenuale Cingulum verläuft somit als kompakte räumliche Struktur entlang des Genu des Corpus callosum und weist im Übergang zum subgenualen Anteil Faservermischungen auf.

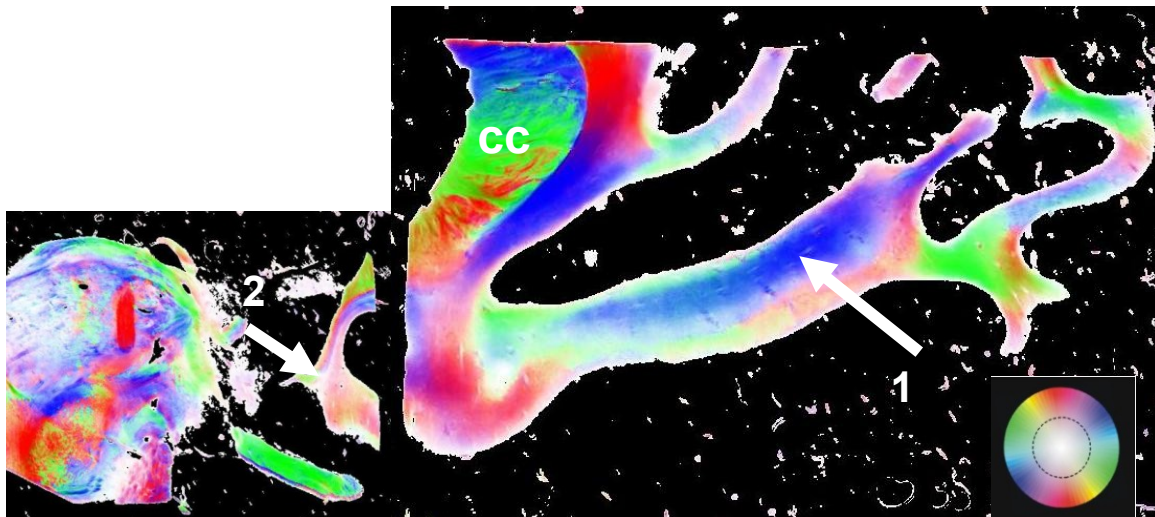




*Abbildung 27:* A: Faserorientierungskarte des prägenualen und subgenualen Abschnittes des anterioren Cingulum der rechten Hemisphäre (medial)  
B: Faserorientierungskarte des prägenualen und subgenualen Abschnittes des anterioren Cingulum der rechten Hemisphäre (lateral)

### 5.2.3 Subgenualer Abschnitt des anterioren Cingulum

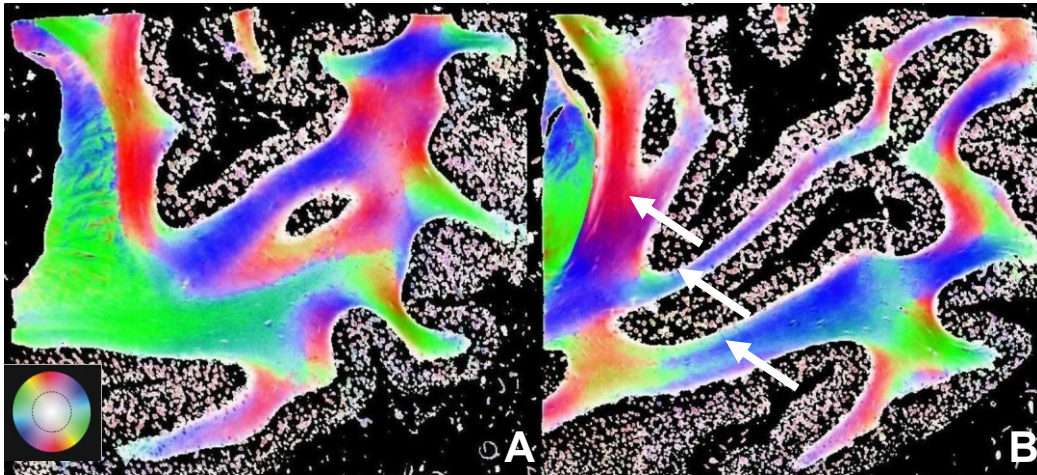
Das kompakte cinguläre Bündel zieht entlang des Genu, verschmälert sich im Bereich des Rostrums und verliert sich im Filum terminale des Corpus callosum. Im Verlauf werden deutliche Faservermischungen erkennbar und es zeigen sich Ausstrahlungen in die orbitofrontale Region. Der Verlauf wird in Abbildung 28 als Faserorientierungskarte dargestellt (*Abbildung 28*). Vertikal verlaufende Fasern (rote Farbe) prägenual setzen sich diagonal (blaue Farbe) entlang des Rostrum des Corpus callosum fort und zeigen Faserausläufe in die orbitofrontale Region (*Abbildung 28*, Pfeil 1). Außerdem zieht ein Teil der Fasern des Cingulum in Richtung des Limen insulae (*Abbildung 28*, Pfeil 2).



*Abbildung 28:* Faserorientierungskarte des subgenualen Anteils des anterioren Cingulum (rechts), cc: Corpus callosum, Pfeil 1: Orbitofrontale Faserausstrahlungen, Pfeil 2: Faserverlauf Richtung Limen insulae

In einigen Bereichen, in denen die subgenualen Fasern des cingulären Bündels in die orbitofrontale Region ausstrahlen, hebt sich die klare Abgrenzung zu den Fasern des benachbarten Corpus callosum auf (*Abbildung 29a*). Somit sind in diesem Abschnitt Faservermischungen zwischen cingulären Faserzügen und Fasern des Corpus callosum erkennbar (grüne Farbe). Neben den oben genannten Faservermischungen existieren außerdem Bereiche, in welchen die Abgrenzbarkeit zwischen Ausstrahlungen des subgenualen anterioren Cingulum und dem Corpus callosum erhalten bleibt (*Abbildung 29b*). Die Faserzüge des cingulären Bündels, die in Richtung der frontalen Großhirnareale orientiert sind, liegen sowohl in Form kompakter Strukturen als auch in Form einzelner Faserzüge vor und verdeutlichen die Faserinteraktion zu anderen kortikalen Regionen.





*Abbildung 29:* Subgenualer Anteil des anterioren Cingulum der rechten Hemisphäre.  
A: Faservermischung mit dem Corpus callosum (grün) und kompakte Ausstrahlung in frontale Kortextareale  
B: Ausstrahlung in frontale Kortextareale in Form einzelner Faserbündel (Pfeile)

Insgesamt konnte das anteriore Cingulum in der vorliegenden Arbeit auf Grundlage des Polarized Light Imaging als kompakte räumliche Struktur der weißen Substanz mit verschiedenen Faservermischungen dargestellt werden. Im posterioren Bereich des anterioren Cingulum bestehen Faserverbindungen zu prämotorischen und motorischen Arealen. Im weiteren Verlauf präsentiert sich das cinguläre Bündel eher als dichte Struktur und weist erst im subgenualen Bereich Faservermischungen und Ausstrahlungen in die orbitofrontale Region sowie zum Limen insulae auf. Auch die sonst bestehende klare Abgrenzung zum Corpus callosum verliert sich teilweise in diesem Abschnitt. Die Darstellung der Faseranatomie des anterioren Cingulum erfolgte in einer Auflösung von  $64\mu\text{m} \times 64\mu\text{m} \times 100\mu\text{m}$ .

Im Folgenden sollen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit vor dem Hintergrund bestehender neuroanatomischer Erkenntnisse erörtert, das wissenschaftliche Potenzial dargestellt und die Methode des Polarized Light Imaging gegenüber anderen Darstellungsmöglichkeiten der Faseranatomie im menschlichen Gehirn diskutiert werden.

## 6 Diskussion

Seit vielen Jahren beschäftigen sich Neurowissenschaftler mit der Darstellung der Architektur der Nervenfasern, wobei Erkenntnisse über die genaue Faseranatomie und Funktion der weißen Substanz des menschlichen Gehirns von zunehmendem wissenschaftlichem und klinischem Interesse sind. Diese Informationen sind für die Erforschung klinischer Fragestellungen wie Störungen der Affektion oder sogenannten Diskonnektivitätssyndromen bedeutsam.

In der vorliegenden Arbeit konnten die Faserzüge der weißen Substanz im anterioren Cingulum des menschlichen Gehirns mittels Polarized Light Imaging visualisiert werden. Dafür wurden sechs menschliche Gehirne seriell geschnitten, digitalisiert und mit Hilfe eines speziellen Algorithmus rekonstruiert und ausgewertet. Aus etwa 6000 Dünnschnittpräparaten und zirka 85.000 Einzeldatensätzen entstanden verschiedene farbkodierte Faserorientierungskarten der unterschiedlichen Regionen des anterioren Cingulum. Die Ergebnisse und Erkenntnisse dieser Studie sollen im Folgenden gegenüber den bestehenden anatomischen Grundlagen des anterioren Cingulum diskutiert und das wissenschaftliche Potential zur Integration in andere bedeutende Forschungsprojekte (Das menschliche Konnektom) dargestellt werden. Weiterhin wird die Bedeutung der Ergebnisse in den wissenschaftlichen Kontext eingeordnet und der Stellenwert des Polarized Light Imaging zur Darstellung der weißen Substanz im menschlichen Gehirn gegenüber anderen Methoden (DTI, Traktografie, mikroskopische Verfahren) diskutiert.

### 6.1 Methoden der Faserdarstellung im menschlichen Gehirn

Aufgrund der Komplexität und Vielfältigkeit des menschlichen Gehirns wurden viele verschiedene Methoden zur Darstellung der Faserarchitektur entwickelt. Die Erforschung von Struktur und Funktion der neuronalen Netzwerke wurde anhand verschiedener morphologischer Grundlagen und Techniken an Lebewesen erforscht. Jede der existierenden Methoden zur visuellen Darstellung des menschlichen Gehirns bildet Strukturen und funktionelle Zusammenhänge in unterschiedlichen Größenordnungen ab (*Abbildung 30*). Dabei wird jede einzelne Methode aufgrund ihres begrenzten Darstellungsbereiches nur spezielle Aspekte einer ausgewählten

Region abbilden können. Für eine annähernd vollständige Darstellung von funktionellen und anatomischen Strukturen des menschlichen Gehirns im Rahmen neuronaler Kartierungen bedarf es demzufolge der Integration der Erkenntnisse unterschiedlicher Details und verschiedener Dimensionen.

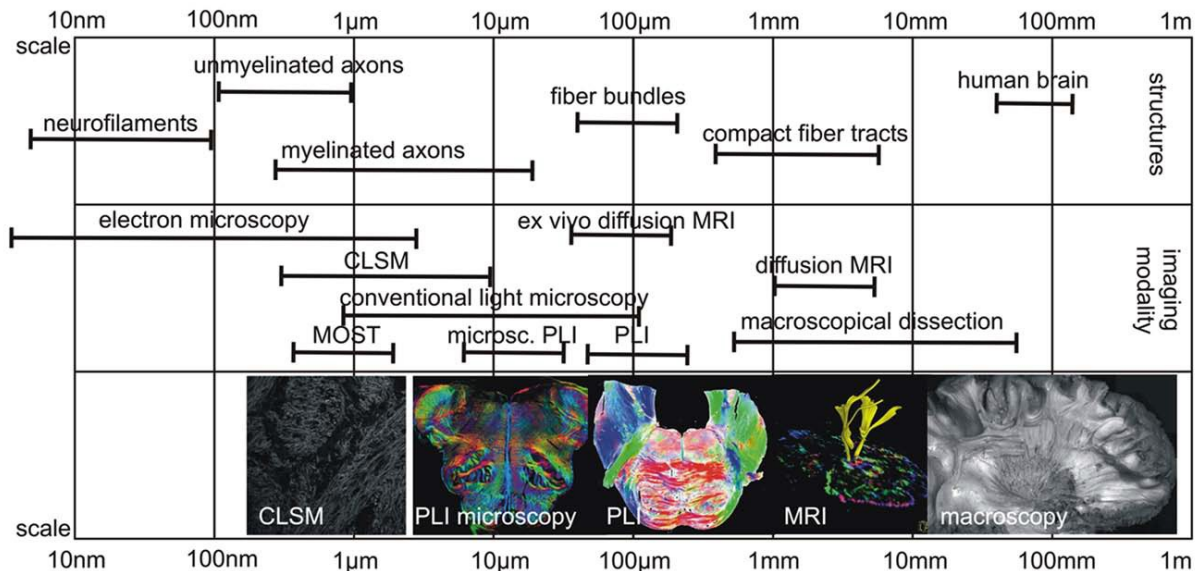


Abbildung 30: Größenordnungen neuroanatomischer Strukturen und Auflösungsvermögen verschiedener Darstellungsmethoden. (Axer H et al. 2011)

Grundsätzlich lassen sich bezüglich neuronaler und struktureller Verbindungen des menschlichen Gehirns folgende drei Dimensionen unterscheiden: Makroebene, Mesoebene und Mikroebene. Die Mikroebene bezieht sich auf die Darstellung einzelner Neuronen und Synapsen. Hierbei können zelluläre Verbindungen und neuronale Prozesse mittels Elektronen- oder Lichtmikroskopie dargestellt werden. Die Makroebene zeigt die grobe Anatomie der Hirnregionen und Faserzüge des gesamten Gehirns, welche mit Hilfe nicht-invasiver bildgebender Methoden an lebenden Individuen Anwendung findet. Die neuronalen Populationen und deren Verknüpfungen und Vernetzungen werden innerhalb der Mesoebene erfasst. Hierbei kommen Methoden wie das Tract Tracing und histologische Untersuchungen auch an nicht-menschlichen Spezies zum Einsatz (Sporns et al. 2005, Sporns 2011).

In den letzten Jahren hat die Entwicklung neuer bildgebender Methoden, serieller Schnittverfahren und technischer Rekonstruktionsmöglichkeiten dazu geführt, dass die Abbildung der zellulären Anatomie des neuronalen Gewebes in extrem hoher und subzellulärer Auflösung möglich ist. Die dreidimensionale Darstellung und

Berechnung komplexer Datensätze auf Grundlage elektronenmikroskopischer Schnitte befindet sich in der Entwicklungsphase (Turaga et al. 2010). Die Rekonstruktion der elektronenmikroskopischen Daten stellt dabei eine wichtige Methode zur Detektion individueller axonaler Prozesse und auch dendritischer Zellen mit entsprechender räumlicher Auflösung dar. Weiterhin kann dieses Grundprinzip genutzt werden, um nicht-neuronale Zelltypen und deren Konnektionen zu anderen Neuronen darzustellen (Sporns 2011). Weitere Möglichkeiten der mikroskopischen Darstellung von Gehirnschnitten bieten die Fluoreszenzmikroskopie und Scanning-Elektronenmikroskopie sowie die dreidimensionale Darstellung von Neuronen unter Verwendung von Immunfluoreszenz-Markern (Lichtman et al. 2008, Micheva und Smith 2007). Durch die Weiterentwicklung mikroskopischer und fluoreszenzmikroskopischer Verfahren mit der Folge einer stetig zunehmenden Auflösung, auch in Kombination mit dem zunehmenden Verständnis der genetischen Grundlagen neuronaler Regelkreise, können zukünftig bisher unerreichte Daten über den Aufbau und das Zusammenwirken neuronaler Strukturen gewonnen werden (Luo et al. 2008, Sporns 2011). Auf diese Weise wäre eine Kartierung des kompletten menschlichen Gehirns auf Mikroebene prinzipiell möglich. Mittels serieller Verfahren müsste die Darstellung der Faseranatomie Quadratmillimeter für Quadratmillimeter erfolgen. Aufgrund der Größe beziehungsweise des Volumens des menschlichen Gehirns erscheint die Rekonstruktion des gesamten Gehirns anhand histologischer Präparate und mikroskopischer Bildgebung deshalb schwierig, äußerst zeitintensiv und wegen der riesigen Datenmengen zum jetzigen Zeitpunkt wenig praktikabel. Die Speicherkapazität für die Rekonstruktion eines menschlichen Gehirns auf mikroskopischer Ebene wird auf etwa ein Exabyte ( $10^{18}$  Bytes) geschätzt (Kasthuri und Lichtman 2010). Mit fortschreitender technologischer Entwicklung sollte dieses Problem lösbar werden. Trotzdem können mikroskopische Verfahren die Faseranatomie nicht am lebenden Gewebe darstellen. Die Rekonstruktion eines Gehirns zeigt eine Momentaufnahme ohne Berücksichtigung der interindividuellen Unterschiede der neuronalen Architektur. Aussagen über Strukturgemeinsamkeiten und -differenzen werden erst durch den Vergleich mehrerer Gehirne möglich, wobei jede einzelne Rekonstruktion äußerst aufwendig wäre (Sporns 2011). Dennoch sind diese Verfahren zur detaillierten Darstellung einzelner Regionen bereits zum jetzigen Zeitpunkt von hoher wissenschaftlicher Bedeutung. Mit modernen histologischen Verfahren zur Untersuchung serieller Gehirnschnitte von postmortalen Gehirnen

gelingt die Darstellung zellulärer und neuronaler Verbindungen ausgewählter Regionen auf mikroarchitektonischer Ebene.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Strukturen der weißen Substanz im menschlichen Gehirn mittels Polarized Light Imaging dargestellt. Es werden Informationen zu Richtung und Neigung von Nervenfasern gewonnen, anhand derer ein Richtungsvektor ermittelt und auf dieser Grundlage die Faserorientierung dargestellt werden kann (Axe M et al. 2011a, Palm et al. 2010). Damit ist die Rekonstruktion von Faserverläufen innerhalb einer größeren Hirnregion möglich und auch die dreidimensionale Rekonstruktion der Faserverläufe des gesamten Gehirns durchführbar (Axe M et al 2011b). Neben der wissenschaftlichen Funktion des Polarized Light Imaging als hochauflösendes Bildgebungsverfahren für die Faseranatomie an postmortalen Präparaten besteht die wesentliche Bedeutung in der Validierung und Verifizierung von Untersuchungsmethoden der in-vivo-Bildgebung des menschlichen Nervensystems.

Die am häufigsten eingesetzte Methode zur Darstellung des Faserverlaufs im menschlichen Gehirn ist die magnetresonanzbasierte Bildgebung (Axe M et al. 2011b, Basser et al. 1994, Mori und Zhang 2006, Tuch et al. 2003). Mittels Diffusion Tensor Imaging (DTI) können neuronale Strukturen auf makrodimensionalem Niveau mit einer Auflösung im Millimeterbereich dargestellt werden. Durch die Bestimmung eines Diffusionstensors liefert das DTI Informationen zur räumlichen Orientierung der myelinisierten Nervenfasern der weißen Substanz (Johansen-Berg und Rushworth 2009). Eine besondere Herausforderung stellt die Auflösung der Faserarchitektur in komplex vernetzten Hirnregionen dar. Mittels spezieller Algorithmen kann die Richtung der anisotropen Diffusion innerhalb definierter Hirnvolumina berechnet und der Verlauf der Nervenfasern dargestellt werden. Dennoch können einzelne Fasern, kleinere Faserzüge, Faserverbindungen oder Nervenkreuzungen komplexer Netzwerke nicht abgebildet werden (Sporns 2011). Varianten der Diffusionsbildgebung, teilweise in Kombination mit Traktografiertechniken, finden bereits am menschlichen Gehirn und anderen Säugetierarten Anwendung (Granziera et al. 2009, Takahashi et al. 2010). Somit können verschiedene Hirnregionen nicht-invasiv unter Verzicht auf mikroskopische Details dargestellt werden. Die Kombination verschiedener Methoden sowie die technische Weiterentwicklung der einzelnen Verfahren führen zu einer stetigen Verbesserung von Auflösung und Sensitivität der magnetresonanzbasierten Bildgebung. Außerdem ist auch die

dreidimensionale Rekonstruktion der neuronalen Strukturen des gesamten Gehirns möglich (Sporns 2011).

Es lässt sich festhalten, dass mittels magnetresonanzbasierenden Verfahren makrodimensionale Informationen großer regionärer Strukturen in vivo gewonnen werden können. Neuroanatomische Daten in höchster Auflösung werden derzeit nur mit mikroskopischen Verfahren erreicht. Hierbei kann jedoch nur ein kleiner Ausschnitt beziehungsweise ein begrenztes Präparat toten Gewebes zur Analyse hinzugezogen werden. Es resultiert eine strukturell anatomische Lücke zwischen höchstauflösendem Mikrokonnektom und in-vivo-Makrokonnektom. In diesem Bereich fungiert das Polarized Light Imaging, welches eine Zwischenstellung zwischen Mikroebene und Makroebene einnimmt und diese Lücke, gerade unter Berücksichtigung der Möglichkeit der dreidimensionalen Rekonstruktion, sinnvoll schließen kann (Axer M et al. 2011a, Sporns 2011).

Die oben diskutierten Methoden zur Darstellung der Nervenfasern im Gehirn ermöglichen einen detaillierten Einblick in die komplexe Anatomie dieses Organs bei Säugetieren und bilden somit die Grundlage für Kartierungen der einzelnen Regionen (Hilgetag et al. 2000, Sporns et al. 2000, Young 1993). Um das Gehirn jedoch im Zusammenwirken seiner einzelnen Bestandteile verstehen zu können, ist die Integration struktureller und funktioneller Einzelerkenntnisse in ein Gesamtmodell notwendig. Die Verwirklichung dieser Aufgabe ist das Ziel des menschlichen Konnektoms.

## 6.2 Das menschliche Konnektom

Wie oben gezeigt wurde, gibt es zahlreiche Methoden zur Darstellung neuroanatomischer Strukturen des menschlichen Gehirns. Mikroskopische Verfahren, magnetresonanzbasierende Methoden oder das Polarized Light Imaging bilden unterschiedliche strukturelle und funktionelle Aspekte in verschiedenen Dimensionen ab. Auf Mikroebene werden einzelne Neurone und Synapsen dargestellt. Die Makroebene zeigt komplette Hirnregionen sowie Faserbündel. Eine Zwischenstellung nimmt die Mesoebene ein. Sie beinhaltet die Darstellung neuronaler Gruppen und deren gegenseitige Verschaltung. Um das Gehirn als komplexes Netzwerk funktionell und strukturell besser zu verstehen, steht die

Zusammenführung dieser Erkenntnisse zu einem integrativen Modell im Fokus wissenschaftlicher Forschungen. Die Erstellung einer Kartierung der strukturellen Verbindungen des menschlichen Gehirns bildet den Kerngedanken des menschlichen Konnektoms (Sporns et al. 2005). Für die Definition des menschlichen Konnektoms sind drei Aspekte von wesentlicher Bedeutung: Es werden in erster Linie die physikalischen Grundlagen struktureller Konnektionen abgebildet. Zweitens handelt es sich um eine Beschreibung zerebraler Verbindungen mit dem Ziel, ein Maximum an Informationen zu gewinnen. Hierbei ist die Integration von Informationen verschiedener Dimensionen notwendig, was nicht bedeutet, dass alle Informationen in der kleinsten Dimension (zum Beispiel auf mikrostruktureller Ebene) dargestellt werden müssen. Als dritten Aspekt gilt es zu berücksichtigen, dass das menschliche Gehirn als Netzwerk dargestellt werden soll. Dabei geht es nicht um die bloße Darstellung einzelner wissenschaftlicher Ergebnisse, sondern um die Vernetzung der einzelnen Strukturen (Sporns 2011). Aufgrund der bekannten strukturellen Komplexität des menschlichen Gehirns soll keine starre Landkarte entstehen, sondern ein Modell aufgezeigt werden, welches neben einer strukturellen Darstellung von zerebralen Konnektionen auch plastische und variable Verläufe integriert.

Um diesen Anspruch zu verwirklichen, sind im Wesentlichen vier Schritte notwendig: Zunächst muss das Gehirn in zusammenhängende Regionen eingeteilt werden, die durch strukturelle Eigenschaften oder neuronale Verschaltungen definiert sind. Im nächsten Schritt wird die gegenseitige Verknüpfung der vorab definierten Regionen durch die Darstellung funktioneller Prozesse oder verbundener Strukturen ermittelt. Aus diesen Ergebnissen wird eine Verknüpfungsmatrix erstellt, sodass relevante Parameter gezielt betrachtet werden können und mittels Netzwerkanalyse der interindividuelle beziehungsweise ein Subgruppenvergleich möglich ist (Bullmore und Sporns 2009). Einen wesentlichen Einfluss auf den Informationsgehalt einer Verknüpfungsmatrix hat die Definition der Voxelgröße. Zu grobe Voxel können neuronale Verbindungen nicht ausreichend spezifisch abbilden und haben die ungewollte Zusammenfassung detaillierter Strukturen zur Folge. Werden die Voxel zu fein definiert, resultiert daraus eine riesige Anzahl unwesentlicher Informationen, die im weiteren Verlauf ausgewertet werden müssen und die Darstellung der Kerninformationen unübersichtlich gestalten (Sporns 2011).

Die Integration verschiedener funktioneller und struktureller Informationen sowie die Entwicklung suffizienter Algorithmen zur Berechnung komplexer Modelle sind die Voraussetzungen für die Komplettierung des menschlichen Konnektoms.

Magnetresonanzbasierte Methoden sind aktuell die am häufigsten angewendeten Verfahren zur in-vivo- und post-mortem-Darstellung der Faseranatomie im menschlichen Gehirn (Axe M et al. 2011b, Englund et al. 2004, Johansen-Berg und Rushworth 2009, Mori und Zhang 2006, Tuch et al. 2003). Um eine umfassende Kartierung aller Hirnregionen und deren neuronaler Verschaltung zu erhalten, ist die Erhebung weiterer struktureller und funktioneller Informationen sowie das Zusammenführen der Erkenntnisse unterschiedlicher Darstellungsmethoden notwendig.

Die mittels Polarized Light Imaging gewonnenen Daten der vorliegenden Arbeit zum Faserverlauf im anterioren Cingulum könnten zu diesem Zweck in das menschliche Konnektom integriert werden.

### 6.3 Faseranatomie des anterioren Cingulum mittels PLI und MR-Verfahren

Das Cingulum als Assoziationsfaserbündel des menschlichen Gehirns, welches eine Zwischenstellung zwischen Neokortex und dem limbischen System einnimmt, besitzt durch vielfältige Konnektionen zu angrenzenden Hirnstrukturen einen wesentlichen Einfluss auf die Steuerung kognitiver Funktionen des Organismus (Rudrauf et al. 2008). Durch die Verbindung zum limbischen System wird die Beteiligung an emotionalen Prozessen deutlich. Somit stellt das Cingulum gewissermaßen eine Brücke zwischen Kognition, Emotion und Verhalten dar (Devinsky et al. 1995, Vogt et al. 1992, Vogt et al. 1995). In klassischen neuroanatomischen Arbeiten (Nieuwenhuys et al. 1988) wird das cinguläre Bündel als eine Ansammlung von kurzen und langen Assoziationsfasern beschrieben, die um das Corpus callosum verlaufen und den Gyrus cinguli mit dem Hippocampus verbinden. Der Gyrus cinguli als Teil des Neokortex wird aufgrund morphologischer Eigenschaften in vier Abschnitte unterteilt: den anterioren cingulären, midcingulären, posterioren cingulären und retrosplenischen Kortex (ACC, MCC, PCC und RSC) (Palomero-Gallagher et al. 2009, Vogt 2005). Der midcinguläre Kortex weist Verbindungen zum



angrenzenden parietalen Kortex auf, wohingegen peri- und subgenualer Kortex in Verbindung zur Amygdala stehen. Funktionell werden dem MCC Einflüsse auf Schmerz und Angstwahrnehmung sowie eine wichtige Rolle bezüglich der Aufmerksamkeit zugeschrieben (Vogt et al. 2003).

Dem anterioren cingulären Kortex (ACC) werden hauptsächlich ausführende Funktionen wie beispielsweise emotionales Verhalten, Schmerzwahrnehmung, Stimmgebung, viszeromotorische und skeletomotorische Kontrolle zugeschrieben. Innerhalb dieses exekutiven anterioren Cingulum werden zusätzlich ein ventraler affektdominierter Abschnitt und ein dorsales kognitives Areal, welches in Schmerzwahrnehmung und Skeletomotorik involviert ist, abgegrenzt. Im affektiven Abschnitt spielen insbesondere Verbindungen zur Amygdala und periaquäduktalem Grau eine Rolle, wohingegen die dorsale Region Projektionen in alle Bereiche des Striatums beinhaltet (Devinsky et al. 1995, Allman et al. 2001).

Die Untersuchung des anterioren Cingulum war auch der Hauptbestandteil der vorliegenden Arbeit. Dazu wurden etwa 6000 Präparate aus dem Bereich des anterioren Cingulum von sechs menschlichen Gehirnen mittels PLI untersucht. Durch die Bestimmung von Maximum- und Minimum-Intensitäten, der Neigung und Richtung von Nervenfasern konnten farbkodierte Faserorientierungskarten des anterioren Cingulum erstellt werden. Wie oben beschrieben wurde, besteht das Cingulum anatomisch aus unterschiedlich langen Fasern, welche um das Corpus callosum ziehen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit präsentieren das anteriore Cingulum dementsprechend als kompaktes Faserbündel, welches eine klare Trennung zum darunter liegenden Corpus callosum aufweist. Die Auswertung nebeneinanderliegender Sagittalschnitte stellt den Verlauf des Cingulum als räumliche Struktur dar. Hierbei wird deutlich, dass die Faserbahnen streng einseitig verlaufen und keine hemisphärenübergreifenden Verbindungen aufweisen. Dieser Verlauf und die Eigenschaft, einzelne Hirnregionen miteinander zu verbinden, ist für Assoziationsfaserbahnen typisch (Schmidt 1979).

Die oben beschriebene Anatomie des anterioren Cingulum konnte in einer Auflösung von  $64\mu\text{m} \times 64\mu\text{m} \times 100\mu\text{m}$  dargestellt werden. Im posterioren Bereich des supracallosalen Cingulum ziehen Fasern der weißen Substanz aus angrenzenden motorischen und prämotorischen Arealen ein. Es lassen sich Faserverbindungen in Richtung des parietalen Kortex aufzeigen. In weiteren Verlauf heben sich diese einstrahlenden Faserzüge auf und Verbindungen zu angrenzenden Hirnregionen

sind nicht mehr darstellbar. Das anteriore Cingulum setzt sich auch prägenual als kompakte Struktur fort, wobei es im subgenualen Bereich erneut zu Vermischungen der Faseranteile kommt. In diesem Bereich weist das Cingulum eine hohe Variabilität auf (vgl. Bürgel et al. 2006). In der vorliegenden Studie zeigen sich hier Nervenfasern mit orbitofrontaler Ausstrahlung sowie Faserzüge in Richtung Limen insulae. Diese diffusen Faservermischungen der subgenualen Region des anterioren Cingulum beinhalten außerdem Fasern aus dem medialen Großhirnbündel des Forceps minor des Corpus callosum.

Die dargestellten Erkenntnisse konnten mittels Polarized Light Imaging in äußerst hoher Auflösung gewonnen werden und verifizieren die bisherigen Erfahrungen zum Faserverlauf im anterioren Cingulum. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sich die Gliederung der kortikalen Regionen besonders des cingulären Gyrus in der Faserarchitektur und Konnektivität des anterioren Cingulum-Bündels wiederfindet.

In verschiedenen DTI-Studien, die sich mit dem cingulären Bündel befassen, konnten äquivalente Ergebnisse im Faserverlauf aufgezeigt werden, wobei die Auflösung etwa 1 bis 2,5mm<sup>3</sup> beträgt (Assaf und Pasternak 2008, Lawes et al. 2008). Auch hier präsentiert sich das Cingulum als kompaktes Faserbündel, in dessen unmittelbarer Nähe U-Fasern lokalisiert sind. Faservermischungen zwischen angrenzenden Faserstrukturen und dem Cingulum lassen sich aufgrund der Auflösung nicht eindeutig darstellen (Lawes et al. 2008). Eine weitere Methode zur räumlichen Darstellung der Nervenbahnen bietet die Traktografie. Auf Grundlage von DTI-Daten ist die dreidimensionale Rekonstruktion von Faserzügen der weißen Substanz möglich. In jedem Voxel erfolgt nach initialer Bildoptimierung die Bestimmung eines Diffusionstensors. Entsprechend anatomischer Grundkenntnisse werden dann Regionen besonderen Interesses (ROI) bestimmt und sogenannte Setzpunkte (seedpoints) festgelegt. In jedem Setzpunkt wird nach einem bestimmten Algorithmus die Diffusionsrichtung bestimmt und mittels MATLAB-Software die räumlichen Dimensionen der Nervenfasern rekonstruiert (Basser et al. 2000, Catani und Thiebaut de Schotten 2008, Lawes et al. 2008). Durch festgelegte Algorithmen und Protokolle für die Auswertung der Daten wird ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit für die rekonstruierten Befunde erreicht (Wakana et al. 2007).

Auch in der Traktografie präsentiert sich das Cingulum als Faserbündel, welches aus unterschiedlich langen Fasern besteht und entlang des Corpus callosum verläuft. Es macht den wesentlichen Anteil der weißen Substanz des Gyrus cinguli aus. Es

stellen sich einige Fasern dar, die das Cingulum verlassen und in Richtung des parietalen Gyrus, frontalen Gyrus und zu anderen angrenzenden Hirnregionen ziehen (Catani et al. 2002).

Da der Axondurchmesser nur einige Mikrometer beträgt und die Auflösung der Traktografie bei etwa 2 bis 5 mm<sup>3</sup> liegt, muss der resultierende Tensor als Durchschnittswert angesehen werden (Ciccarelli et al. 2008, Keyserlingk und Schramm 1984). Das macht die Rekonstruktion vor allem in Bereichen interagierender Faszikel schwierig. Das Nichterfassen vorhandener Faserzüge führt zu falsch-negativen Ergebnissen. Die Rekonstruktion nicht vorhandener Nervenfasern hat falsch-positive Befunde zur Folge (Johansen-Berg und Behrens 2006).

Die Traktografie auf Grundlage konventioneller DTI-Technik birgt außerdem das Risiko der Bildverzerrung und Artefaktbildung. Aus diesem Grund können einzelne Faserzüge verdreht dargestellt werden. Technische Variationen, wie beispielsweise das „Turboprop-Imaging“, reduzieren die Anfälligkeit der Traktografie bezüglich dieser Artefakte. Die Scan-Zeit der Methode beträgt etwa 20 Minuten.

Auch mit diesen Verfahren stellt sich das anteriore Cingulum als kompakte Struktur dar, welche entlang des darunter liegenden Corpus callosum zieht und in Richtung des parietalen Kortex oder in die orbitofrontale Region ausstrahlt. Eine hochauflösende Darstellung einzelner kleiner Faserzüge und im Bereich der Faserenden ist nur begrenzt möglich (Arfanakis et al. 2005). Die Diskriminierung zwischen anterogradem und retrogradem Verlauf der Faszikel ist weder mit magnetresonanzbasierten Verfahren noch mittels Polarized Light Imaging möglich.

Nachdem die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zur Darstellung der Faseranatomie des anterioren Cingulum mittels Polarized Light Imaging im Kontext mit magnetresonanzbasierten Methoden erörtert wurden, sollen diese Methoden im Folgenden gegenüberstellend diskutiert werden.

## 6.4 Methodenvergleich PLI und DTI

Wie schon in den vorherigen Abschnitten der Arbeit ausgeführt wurde, existieren verschiedene Methoden zur Darstellung der Nervenfasern und speziell der weißen Substanz des menschlichen Gehirns. Jede dieser Methoden liefert spezifische

Informationen zum untersuchten Gewebe beziehungsweise der entsprechenden Hirnregion. Diese selektiven Ergebnisse liefern beispielsweise Informationen über die Konnektivität zwischen unterschiedlichen kortikalen Abschnitten, den zytoarchitektonisch-histologischen Feinbau der Nervenzellen oder die Faserorientierung einzelner Nervenbahnen (Sporns 2011).

Die Darstellung der Faserorientierung in zweidimensionaler oder dreidimensionaler Form ist im Wesentlichen mittels Polarized Light Imaging, der Methode der vorliegenden Arbeit, und dem Diffusion Tensor Imaging möglich. Obwohl beide Methoden ähnliche neuronale Aspekte aufzeigen, unterscheiden sie sich grundlegend in Methodik und Funktionsweise. Das PLI bedient sich des Prinzips der Polarisation und der doppelbrechenden Eigenschaften der myelinisierten Nervenfasern (Axe et al. 2000, Axe et al. 2001). DTI ist ein magnetresonanz-basiertes Verfahren, welches auf Grundlage der anisotropen Diffusion von Wasser im Hirngewebe funktioniert (Basser et al. 1994, Mori und Zhang 2006). Während durch das PLI Neigungs- und Richtungswinkel erstellt werden, aus denen sich anschließend farbkodierte Faserorientierungskarten berechnen lassen, wird beim DTI zur Darstellung der Faserorientierung ein Tensor als Durchschnittswert der Wasserdiffusion in jedem einzelnen Voxel bestimmt. Anhand dieser Tatsache ergibt sich auch die limitierte Auflösung des DTI im Kubikmillimeterbereich. Die Darstellung der neuronalen Faserbahnen im Mikrometerbereich ist ein wesentlicher Vorteil des PLI. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten mit einer Auflösung von  $64\mu\text{m} \times 64\mu\text{m} \times 100\mu\text{m}$  präsentiert werden. Die dreidimensionale Rekonstruktion bestimmter Hirnregionen ist prinzipiell für beide Methoden möglich, wobei die Mehrzahl der 3D-Rekonstruktionen aktuell auf Daten des DTI beruht (Axe M et al. 2011a, Palm et al. 2010, Sporns 2011). Wesentliche Gründe dafür dürften zum einen die geringe Scan-Zeit des DTI und die in-vivo-Darstellung der Faseranatomie sein. Der große Arbeits- und Zeitaufwand bei der Präparation, der Erstellung der seriellen Gehirnschnitte und der Digitalisierung sowie der Nachbearbeitung der Daten stellt einen wesentlichen Nachteil des PLI gegenüber dem DTI dar.

Die Differenzierung des Faserverlaufs in Richtung  $x$  und Richtung  $x+180^\circ$  ist weder mit PLI noch mit DTI möglich. Auch die Darstellung im Bereich von senkrecht zueinander verlaufenden Nervenfaserkreuzungen gestaltet sich für beide Verfahren schwierig (Axe H et al. 2011, Ciccarelli et al. 2008).

Die wesentlichen Vor- und Nachteile von PLI und DTI sind in der folgenden Tabelle übersichtlich zusammengefasst (*Tabelle 4*):

Methode	PLI	DTI
Prinzip	Polarisation des Lichtes	Magnetresonanz
physikalische Grundlage	Doppelbrechung von myelinisierten Nervenfasern	anisotrope Diffusion von Wasser in Hirngewebe
Ziel/ Ergebnis	histologische Darstellung der Faserorientierung 3D-Rekonstruktion	makrodimensionale Darstellung der Faserorientierung 3D-Rekonstruktion
methodischer Zielwert	Neigungswinkel Richtungswinkel	Tensor
Auflösung	64µm x 64µm x 100µm	1 bis 5 mm <sup>3</sup>
Material	Post-mortem-Dünnschnittpräparate	lebende Probanden Post-mortem-Präparate
Vorteile	sehr hohe Auflösung Darstellung sehr kleiner Areale Darstellung ganzer Faserzüge	in-vivo-Darstellung Verlaufsuntersuchungen relativ einfache Handhabung
Nachteile	hoher Arbeits- und Zeitaufwand nur post-mortem-Präparate kleine Fallgruppen	niedrigere Auflösung Darstellung nur auf makrodimensionaler Ebene

*Tabelle 4:* Gegenüberstellung von PLI und DTI

Um ein komplexes Modell des Gehirns im Sinne des menschlichen Konnektoms verwirklichen zu können, ist der Einsatz sich gegenseitig ergänzender Methoden notwendig. Während das DTI die wesentlichen Informationen der Makroebene liefert, stellt das PLI vor allem mesodimensionale Aspekte des menschlichen Gehirns dar (Axe M et al. 2011a, Sporns 2011). Um eine suffiziente Kartierung des gesamten menschlichen Konnektoms zu ermöglichen und eine unabhängige Methode zur Validierung der bisher gewonnenen DTI-Daten zu besitzen, ist die Untersuchung anderer Hirnregionen mittels PLI von hohem wissenschaftlichem Interesse.

## 6.5 Anwendung von PLI in anderen Hirnregionen

Seit der Entwicklung des PLI vor etwa 10 Jahren (Axe et al. 2000, Axe et al. 2001) als Methode zur Darstellung der Faserorientierung in histologischen Gehirnschnitten mit wesentlich höherer Auflösung als magnetresonanzbasierte Methoden wurden Projekte zur detaillierten Kartierung des menschlichen Gehirns weiter forciert. Mit der Absicht, einen farbkodierten Atlas des menschlichen Gehirns zu rekonstruieren, wurden mittels PLI verschiedene Hirnregionen sowie sagittale und horizontale Gehirnschnitte des gesamten Kortex dargestellt. Im Folgenden wird ein kurzer Überblick der bisher mittels PLI untersuchten Hirnregionen gegeben.

Zur Darstellung von Medulla oblongata, Pons und Mesencephalon wurden in einer früheren Studie der Arbeitsgruppe sechs menschliche Hirnstämme, vergleichbar zur Methodik der vorliegenden Arbeit, axial zur Hirnstammebene seriell geschnitten und jeder zweite Schnitt mittels PLI untersucht (Axe et al. 2002). Hierbei konnte die Faseranatomie der großen Nervenbahnen des Hirnstammes, wie beispielsweise der Pyramidenbahn, des Lemniscus medialis und des Fasciculus longitudinalis medialis, aufgezeigt werden. Durch die hohe Auflösung war nicht nur die Darstellung großer Nervenbahnen, sondern auch die Abbildung der kleineren Faserbündel innerhalb dieser Regionen möglich. Anhand dieser Daten konnte mittels manueller Segmentierung eine dreidimensionale Rekonstruktion der Pyramidenbahn und des Lemniscus medialis vorgenommen werden.

Auch die Capsula interna steht im Fokus wissenschaftlichen Interesses, da hier Anteile der Pyramidenbahn, der Thalamustrahlung und corticopontine Fasersysteme verlaufen und Vermischungen aufweisen (Trepel 2008). Mittels PLI konnten hier vergleichbar mit Ergebnissen durch konfokale Lasermikroskopie die individuelle Orientierung und Ausrichtung der Faserbündel und die Gliederung der Capsula interna dargestellt werden. Weiterhin war es möglich, rechts-links hemisphärische Unterschiede, wie mehrere und kleinere Bündel der frontopontinen Bahnen, im Bereich des anterioren Teils der Capsula interna zu visualisieren (Axe et al. 1999, Axe und Keyserlingk 2000).

Im Bereich der Capsula extrema konnten mittels PLI verschiedene Faserzüge zum Operculum und orbitofrontalen Kortex sowie deren Verbindungen zu anderen Fasersystemen, wie dem Fasciculus uncinatus, dargestellt werden (Axe H et al. 2011). Die visualisierten Nervenbahnen der Capsula extrema zwischen Claustrum

und Inselkortex wurden den Ergebnissen makroskopischer Präparationen oder Traktografiertechniken gegenübergestellt (Saur et al. 2010).

Auf diese Weise ist es möglich jede einzelne Region des menschlichen Gehirns oder neuronale Strukturen anderer Individuen mit sehr hoher Auflösung darzustellen. Um die gewonnenen Erkenntnisse besser visualisieren und den konkreten Faserverlauf in räumlicher Ausdehnung nachvollziehen zu können, ist eine dreidimensionale Rekonstruktion der PLI-Daten von hohem Interesse. Auf dieses Verfahren soll im folgenden Abschnitt näher eingegangen werden.

## 6.6 3D-Rekonstruktion mittels PLI

Mittels zweidimensionalem Polarized Light Imaging wurden schon zahlreiche Regionen des menschlichen Gehirns untersucht und dargestellt. Anhand dieser Daten ist auch eine dreidimensionale Rekonstruktion von neuronalen Strukturen möglich. Die Methode des 3D-Polarized Light Imaging (3D-PLI) basiert ebenfalls auf den doppelbrechenden Eigenschaften der Myelinscheiden der Nervenfasern (Axe M et al. 2011b). Anhand von 100µm starken Gehirnschnitten werden, vergleichbar zur Methodik der vorliegenden Arbeit, Faserorientierungskarten (FOM) erstellt und Regionen besonderen Interesses (ROI) bestimmt. Für ein definiertes Volumen besonderen Interesses (VOI) ist anschließend die dreidimensionale Rekonstruktion der Faserverläufe mittels MATLAB-Algorithmus möglich (Axe M et al. 2011b). Das 3D-PLI ermöglicht somit die räumliche Darstellung neuronaler Strukturen auf Mesoebene (Palm et al. 2010).

Um das menschliche Konnektom als komplexes Netzwerk verstehen zu können, ist die Integration der Erkenntnisse unterschiedlicher und sich ergänzender Darstellungsmethoden notwendig (Axe M et al. 2011a, Axe M et al. 2011b). Dreidimensional rekonstruierte Bilder mikroskopischer Verfahren liefern äußerst detaillierte Informationen neuronaler Anatomie (Lichtman et al. 2008). Die Anwendung ist aber nur für sehr kleine Bereiche möglich. Demgegenüber liefert die DTI-Traktographie in kurzer Zeit dreidimensionale in-vivo-Darstellungen grober Faserverläufe in einer Auflösung zwischen 2 bis 5 mm<sup>3</sup> (Ciccarelli et al. 2008). Die erzielte Auflösung liegt damit weit unter den Dimensionen kleiner Faserbündel und Axone. Mittels 3D-PLI ist die Darstellung sowohl langer Faserzüge als auch kurzer

Abschnitte der weißen Substanz in ausreichend hoher Auflösung möglich (Axe M et al. 2011b). Die dreidimensionale Rekonstruktion von Nervenbahnen mittels 3D-PLI findet zunehmend Bedeutung als unabhängige Methode zur Evaluierung der in-vivo-Traktografie (Palm et al. 2010).

Da die dreidimensionale Rekonstruktion des 3D-PLI auf Grundlage zahlreicher Dünnschnittpräparate von etwa 100µm Dicke erfolgt, ist die Methode anfällig für Verdrehungen und Verzerrungen der dargestellten Faserzüge. In Grenzregionen zwischen weißer und grauer Substanz, die durch einen starken Gradienten der Myelinisierung gekennzeichnet sind, kann es in der dreidimensionalen Rekonstruktion zu Fehlinterpretationen der Faserneigung kommen. Durch verschiedene Computer-Algorithmen können einige Artefakte ausgeglichen werden. Dazu zählen unter anderem die Anwendung von rigider oder nicht-linearer Transformation sowie die Reorientierung von Faserorientierungsvektoren (Axe M et al. 2011b, Palm et al. 2010).

Aufgrund der Komplexität der 3D-PLI-Datensets können nur Volumina besonderen Interesses (VOI) einer beschränkten Größe rekonstruiert werden (etwa 300mm<sup>3</sup>). Deshalb konnte die dreidimensionale Rekonstruktion des gesamten menschlichen Gehirns mittels 3D-PLI aktuell noch nicht verwirklicht werden (Axe M et al. 2011b).

Insgesamt repräsentiert das 3D-PLI eine unabhängige Methode gegenüber den magnetresonanzbasierten Verfahren, um die bisherigen Erkenntnisse zu validieren und die Kartierung des menschlichen Gehirns auf mikroskopischer Ebene weiter voranzubringen (Palm et al. 2010). 3D-PLI stellt somit eine Schlüsselmethode dar, um durch die Darstellung der Faserarchitektur auf Mesoebene die Erkenntnisse von Makro- mit Mikrokonnektom zu verbinden (Axe M et al. 2011a, Axe M et al. 2011b).



## **7 Schlussfolgerung**

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die mikrostrukturelle Analyse des anterioren Cingulum-Bündels mittels PLI. Nach makroskopischer Präparation und Erstellung der Dünnschnittpräparate konnten nach Anfertigung von Intensitäts-, Faserneigungs- und Faserrichtungskarten mittels MATLAB-Algorithmus anschließend farbkodierte Faserorientierungskarten dieser Hirnregion erstellt werden. Das anteriore Cingulum präsentiert sich als kompaktes Faserbündel mit klarer Abgrenzung zum darunter liegenden Corpus callosum. Im posterioren Bereich des supracallosalen Cingulum werden Faserzüge aus angrenzenden motorischen und prämotorischen Arealen sichtbar. Prägenual setzt sich das Cingulum als dichte Struktur fort und weist im subgenualen Bereich Faservermischungen sowie orbitofrontale Ausstrahlungen in Richtung Limen insulae auf. Die gewonnen Erkenntnisse wurden mit weit höherer Auflösung als bei magnetresonanzbasierten Verfahren erstellt und verifizieren die bisherigen Ergebnisse zum Faserverlauf im anterioren Cingulum. Bestehende Probleme, wie die Definition des Faserverlaufes in Richtung  $x$  oder  $x+180^\circ$ , könnten zukünftig durch physikalische Innovationen des PLI behoben werden. Auch die Weiterentwicklung der Automatisierung zur Erstellung der Dünnschnittpräparate ist notwendig, um die Anwendung des PLI zu vereinfachen, das Verfahren zu standardisieren und den limitierenden Aspekt des zeitlichen Aufwandes zu minimieren. Mit der technischen Verbesserung der optischen Komponenten des PLI wird die Darstellung der Faseranatomie in zunehmend hoher Auflösung möglich sein. Die Abbildung der Faseranatomie mittels PLI ist nicht auf Strukturen der weißen Substanz begrenzt, sondern prinzipiell auch für die graue Substanz möglich. Neben fokussierten Untersuchungen zu einer bestimmten Hirnregion können auch Faserorientierungskarten von Ganzhirnschnitten erstellt werden.

Anhand all dieser Aspekte wird die zukünftige Bedeutung des PLI zur Validierung bereits bestehender Daten zur Faseranatomie im menschlichen Gehirn sowie zur Erforschung neuer neuroarchitektonischer Erkenntnisse ersichtlich. Auch der geleistete Beitrag zur Komplettierung des menschlichen Konnektoms durch die Präsentation mesodimensioneller Aspekte erscheint von hohem klinischem Interesse. Die dreidimensionale Rekonstruktion vorhandener PLI-Datensätze sowie die Erweiterung und Verifizierung der bisherigen Ergebnisse anhand größerer Fallzahlen wird die Aufgabe folgender PLI-Studien sein.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Alanen YO. 2001. Schizophrenia. Its origins and need-adapted treatment. Stuttgart: Klett-Cotta.
2. Allman JM, Hakeem A, Erwin JM, Nimchinsky E, Hof P. 2001. The anterior cingulate cortex. The evolution of an interface between emotion and cognition. *Ann N Y Acad Sci.* 935:107-17.
3. Arfanakis K, Gui M, Lazar M. 2005. White matter tractography by means of Turboprop diffusion tensor imaging. *Ann N Y Acad Sci.* 1064:78-87.
4. Assaf Y, Pasternak O. 2008. Diffusion tensor imaging (DTI)-based white matter mapping in brain research: a review. *J Mol Neurosci.* 34(1):51-61.
5. Axer H, Axer M, Krings T, Keyserlingk DG. 2001. Quantitative estimation of 3-D fiber course in gross histological sections of the human brain using polarized light. *J Neurosci Methods.* 105 (2):121-31.
6. Axer H, Beck S, Axer M, Schuchardt F, Heepe J, Flücken A, Axer M, Prescher A, Witte OW. 2011. Microstructural analysis of human white matter architecture using polarized light imaging: views from neuroanatomy. *Front Neuroinform.* 5:28.
7. Axer H, Berks G, Keyserlingk DG. 2000. Visualization of nerve fiber orientation in gross histological sections of the human brain. *Microsc Res Tech.* 51 (5):481-492.
8. Axer H, Keyserlingk DG. 2000. Mapping of fiber orientation in human internal capsule by means of polarized light and confocal scanning laser microscopy. *J Neurosci Methods.* 94 (2):165-75.
9. Axer H, Leunert M, Mürköster M, Grässel D, Larsen L, Griffin LD, Graf v Keyserlingk D. 2002. A 3D fiber model of the human brainstem. *Comput Med Imaging Graph.* 26 (6):439-44.
10. Axer H, Lippitz BE, von Keyserlingk DG. 1999. Morphological asymmetry in anterior limb of human internal capsule revealed by confocal laser and polarized light microscopy. *Psychiatry Res.* 91(3):141-54.
11. Axer M, Amunts K, Grässel D, Palm C, Dammers J, Axer H, Pietrzyk U, Zilles K. 2011a. A novel approach to the human connectome: ultra-high resolution mapping of fiber tracts in the brain. *Neuroimage.* 54(2):1091-101.

12. Axer M, Grassel D, Kleiner M, Dammers J, Dickscheid T, Reckfort J, Hütz T, Eiben B, Pietrzyk U, Zilles K, Amunts K. 2011b. High-resolution fiber tract reconstruction in the human brain by means of three-dimensional polarized light imaging. *Front Neuroinform.* 5:34.
13. Baiano M, David A, Versace A, Churchill R, Balestrieri M, Brambilla P. 2007. Anterior cingulate volumes in schizophrenia: a systematic review and a meta-analysis of MRI studies. *Schizophr Res.* 93(1-3):1–12.
14. Basser PJ, Mattiello J, LeBihan D. 1994. Estimation of the effective self-diffusion tensor from the NMR spin echo. *J Magn Reson B.* 103(3):247-54.
15. Basser PJ, Pajevic S, Pierpaoli C, Duda J, Aldroubi A. 2000. In vivo fiber tractography using DT-MRI data. *Magn. Reson. Med.* 44(4):625-32.
16. Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. 2006. *Neuroscience: Exploring the Brain.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 568-69.
17. Benes FM, Bird ED. 1987. An analysis of the arrangement of neurons in the cingulate cortex of schizophrenic patients. *Arch Gen Psychiatry.* 44(7):608–16.
18. Benes FM. 1993. Neurobiological investigations in cingulate cortex of schizophrenic brain. *Schizophr Bull.* 19(3):537-49.
19. Bouras C, Kövari E, Hof PR, Riederer BM, Giannakopoulos P. 2001. Anterior cingulate cortex pathology in schizophrenia and bipolar disorder. *Acta Neuropathol.* 102(4):373-9.
20. Broca P. 1878. Anatomie comparée des circonvolutions cérébrales: le grand lobe limbique et le scissure limbique dans la série des mammifières. *Rev d'Anthrop Par.* 385-498.
21. Brodmann K. 1909. *Vergleichende Lokalisationslehre der Grosshirnrinde in ihren Prinzipien, dargestellt aufgrund des Zellenbaues.* Leipzig: Johann Ambrosius Barth Verlag.
22. Brown AS, Schaefer CA, Wyatt RJ, Goetz R, Begg MD, Gorman JM, Susser ES. 2000. Maternal exposure to respiratory infections and adult schizophrenia spectrum disorders: a prospective birth cohort study. *Schizophr Bulletin.* 26(2):287-95
23. Bullmore E, Sporns O. 2009. Complex brain networks: graph theoretical analysis of structural and functional systems. *Nat Rev Neurosci.* 10(3):186–98.

24. Bürgel U, Amunts K, Hoemke L, Mohlberg H, Gilsbach JM, Zilles K. 2006. White matter fiber tracts of the human brain: three-dimensional mapping at microscopic resolution, topography and intersubject variability. *Neuroimage* 29(4):1092-105.
25. Bush G, Luu P, Posner MI. 2000. Cognitive and emotional influences in anterior cingulate cortex. *Trends Cogn Sci.* 4(6):215–22.
26. Cannistraro PA, Makris N, Howard JD, Wedig MM, Hodge SM, Wilhelm S, Kennedy DN, Rauch SL. 2007. A diffusion tensor imaging study of white matter in obsessive-compulsive disorder. *Depress Anxiety.* 24(6):440-6.
27. Catani M, Howard RJ, Pajevic S, Jones DK. 2002. Virtual in vivo interactive dissection of white matter fasciculi in the human brain. *Neuroimage*, 17(1): 77-94.
28. Catani M, Thiebaut de Schotten M. 2008. A diffusion tensor imaging tractography atlas for virtual in vivo dissections. *Cortex.* 44(8):1105-32.
29. Ciccarelli O, Catani M, Johansen-Berg H, Clark C, Thompson A. 2008. Diffusion-based tractography in neurological disorders: concepts, applications, and future developments. *Lancet Neurol.* 7(8):715-27.
30. Concha L, Gross DW, Beaulieu C. 2005. Diffusion tensor tractography of the limbic system. *AJNR Am J Neuroradiol.* 26(9):2267-74.
31. Craddock N, O'Donovan MC, Owen MJ. 2005. The genetics of schizophrenia and bipolar disorder: dissecting psychosis. *J Med Genet.* 42(3):193-204.
32. Crank J. 1956. *The Mathematics of Diffusion.* London: Oxford Univ Press.
33. de Campos Vidal B, Mello ML, Caseiro-Filho AC, Godo C. 1980. Anisotropic properties of the myelin sheath. *Acta Histochem*, 66(1):32-9.
34. de Groot M, Vernooij MW, Klein S, Leemans A, de Boer R, van der Lugt A, Breteler MM, Niessen WJ. 2009. Iterative co-linearity filtering and parameterization of fiber tracts in the entire cingulum. *Med Image Comput Comput Assist Interv.* 12(Pt 1):853-60.
35. Dejerine J. 1895. *Anatomie des centres nerveux.* Paris: Rueff et Cie.
36. Devinsky O, Morell MJ, Vogt BA. 1995. Contributions of anterior cingulate cortex to behaviour. *Brain.* 118(Pt1):279-306.
37. Dubin M. 2005. *Brodman Areas in the Human Brain with an Emphasis on Vision and Language.* <http://spot.colorado.edu/~dubin/talks/brodmann/brodmann.html>.

38. Englund E, Sjöbeck M, Brockstedt S, Lätt J, Larsson EM. 2004. Diffusion tensor MRI postmortem demonstrated cerebral white matter pathology. *J Neurol.* 251(3):350–2.
39. Fornito A, Yücel M, Wood S, Stuart GW, Buchanan JA, Proffitt T, Anderson V, Velakoulis D, Pantelis C. 2004. Individual differences in anterior cingulate/paracingulate morphology are related to executive functions in healthy males. *Cereb Cortex.* 14(4):424-31.
40. Meschede D. 1995. Gerthsen Physik. 22. Auflage. Berlin Heidelberg New York: Springer Verlag.
41. Geschwind N. 1965. Disconnexion syndromes in animals and man. *Brain.* 88: 237-94
42. Gong G, Jiang T, Zhu C, Zang Y, He Y, Xie S, Xiao J. 2005. Side and handedness effects on the cingulum from diffusion tensor imaging. *Neuro Report.* 16(15):1701-5.
43. Gottesman II. 1991. Schizophrenia Genesis. New York: W. H. Freeman and Company.
44. Göthlin G. 1913. Die doppelbrechenden Eigenschaften des Nervengewebes, ihre Ursachen und ihre biologischen Konsequenzen. Uppsala: Almqvist & Wiksell.
45. Granziera C, Schmahmann JD, Hadjikhani N, Meyer H, Meuli R, Wedeen V, Krueger G. 2009. Diffusion spectrum imaging shows the structural basis of functional cerebellar circuits in the human cerebellum in vivo. *PLoS One.* 4(4): e5101.
46. Gray H. 1918. Anatomy of the Human Body. Philadelphia: Lea & Febiger.
47. Griffin LD. 1994. The intrinsic geometry of the cerebral cortex. *J Theor Biol.* 166(3):261-73.
48. Hagmann P, Jonasson L, Deffieux T, Meuli R, Thiran JP, Wedeen VJ. 2006. Fibertract segmentation in position orientation space from high angular resolution diffusion MRI. *Neuroimage.* 32(2):665-75.
49. Haskell RC, Carlson FD, Blank PS. 1989. Form birefringence of muscle. *Biophys J.* 56 (2):401-13.
50. Haznedar MM, Buchsbaum MS, Hazlett EA, Shihabuddin L, New A, Siever LJ. 2004. Cingulate gyrus volume and metabolism in the schizophrenia spectrum. *Schizophr Res.* 71(2-3):249-62.

51. Heimer J, Zaborszky L. 1989. Neuroanatomical Tract-Tracing Methods: Recent Progress. New York: Plenum.
52. Hilgetag CC, Burns GA, O'Neill MA, Scannell JW, Young MP. 2000. Anatomical connectivity defines the organization of clusters of cortical areas in the macaque monkey and the cat. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 355(1393):91–110.
53. Huster RJ, Westerhausen R, Kreuder F, Schweiger E, Wittling W. 2007. Morphologic asymmetry of the human anterior cingulate cortex. *Neuroimage:* 34(3):888-95.
54. Huster RJ, Westerhausen R, Kreuder F, Schweiger E, Wittling W. 2009. Hemispheric and gender related differences in the midcingulum bundle: a DTI study. *Hum Brain Mapp:* 30(2):383-91.
55. Johansen-Berg H, Behrens TE. 2006. Just pretty pictures? What diffusion tractography can add in clinical neuroscience. *Curr Opin Neurol.* 19(4):379-85.
56. Johansen-Berg H, Rushworth MFS. 2009. Using diffusion imaging to study human connectional anatomy. *Annu Rev Neurosci.* 32:5–94.
57. Kasthuri N, Lichtman JW. 2010. Neurocartography. *Neuropsychopharmacology.* 35(1):342–3.
58. Keyserlingk DGv, Schramm U. 1984. Diameter of axons and thickness of myelin sheaths of the pyramidal tract fibres in the adult human medullary pyramid. *Anat Anz:* 157(2):97-111.
59. Konrad A, Winterer G. 2008. Disturbed structural connectivity in schizophrenia primary factor in pathology or epiphenomenon? *Schizophr Bull.* 34(1):72-92.
60. Koski L, Paus T. 2000. Functional connectivity of the anterior cingulate cortex within the human frontal lobe: a brain-mapping meta-analysis. *Exp Brain Res.* 133(1):55–65
61. Kubicki M, Westin CF, Nestor PG, Wible CG, Frumin M, Maier SE, Kikinis R, Jolesz FA, McCarley RW, Shenton ME. 2003. Cingulate fasciculus integrity disruption in schizophrenia: a magnetic resonance diffusion tensor imaging study. *Biol Psychiatry.* 54(11):1171-80.
62. Lanciego JL, Wouterlood FG. 2000. Neuroanatomical tract-tracing methods beyond 2000: what's now and next. *J Neurosci Methods,* 103(1):1-2.
63. Larsen L, Griffin LD, Grässel D, Witte OW, Axer H. 2007. Polarized light imaging of white matter architecture. *Microsc Res Tech.* 70(10):851-63.

64. Lawes IN, Barrick TR, Murugam V, Spierings N, Evans DR, Song M, Clark CA. 2008. Atlas-based segmentation of white matter tracts of the human brain using diffusion tensor tractography and comparison with classical dissection. *Neuroimage*. 39(1):62-79.
65. Lawrie SM, Abukmeil SS. 1998. Brain abnormality in schizophrenia. A systematic and quantitative review of volumetric magnetic resonance imaging studies. *Br J Psychiatry*. 172:110-20.
66. Lawrie SM, Whalley HC, Abukmeil SS, Kestelman JN, Donnelly L, Miller P, Best JJ, Owens DG, Johnstone EC. 2001. Brain structure, genetic liability, and psychotic symptoms in subjects at high risk of developing schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 49(10):811-23.
67. Lawrie SM, Johnstone EC, Weinberger DR. 2004. *Schizophrenia: From Neuroimaging to Neuroscience*. Oxford: Oxford University Press.
68. Lawrie SM, Hall J, McIntosh AM, Cunningham-Owens DG, Johnstone EC. 2008. Neuroimaging and molecular genetics of schizophrenia: pathophysiological advances and therapeutic potential. *Br J Pharmacol*. 153(suppl1):120-4.
69. Lewis CM, Levinson DF, Wise LH, DeLisi LE, Straub RE, Hovatta I, Williams NM, Schwab SG, Pulver AE, Faraone SV, Brzustowicz LM, Kaufmann CA, Garver DL, Gurling HM, Lindholm E, Coon H, Moises HW, Byerley W, Shaw SH, Mesen A, Sherrington R, O'Neill FA, Walsh D, Kendler KS, Ekelund J, Paunio T, Lönngqvist J, Peltonen L, O'Donovan MC, Owen MJ, Wildenauer DB, Maier W, Nestadt G, Blouin JL, Antonarakis SE, Mowry BJ, Silverman JM, Crowe RR, Cloninger CR, Tsuang MT, Malaspina D, Harkavy-Friedman JM, Svrakic DM, Bassett AS, Holcomb J, Kalsi G, McQuillin A, Brynjolfson J, Sigmundsson T, Petursson H, Jazin E, Zoëga T, Helgason T. 2003. Genome scan meta-analysis of schizophrenia and bipolar disorder, part II: Schizophrenia. *Am J Hum Genet*. 73(1):34-48.
70. Lichtman JW, Livet J, Sanes JR. 2008. A technicolour approach to the connectome. *Nat Rev Neurosci*. 9(6):417-22.
71. Ludwig E, Klingler J. 1956. *Atlas cerebri humani. Der innere Bau des Gehirns dargestellt auf Grund makroskopischer Präparate. The inner structure of the brain demonstrated on the basis of macroscopical preparations*. Boston: Little, Brown.

72. Luo L, Callaway EM, Svoboda K. 2008. Genetic dissection of neural circuits. *Neuron* 57(5):634–60.
73. Makris N, Worth AJ, Sorensen AG, Papadimitriou GM, Wu O, Reese TG, Wedeen VJ, Davis TL, Stakes JW, Caviness VS, Kaplan E, Rosen BR, Pandya DN, Kennedy DN. 1997. Morphometry of in vivo human white matter association pathways with diffusion-weighted magnetic resonance imaging. *Ann Neurol*. 42(6):951-62.
74. Mark LP, Daniels DL, Naidich TP, Borne JA. 1993. Limbic system anatomy: an overview. *AJNR Am J Neuroradiol*. 14(2):349-52.
75. Mayberg HS, Lozano AM, Voon V, McNeely HE, Seminowicz D, Hamani C, Schwalb JM, Kennedy SH. 2005. Deep brain stimulation for treatment-resistant depression. *Neuron*. 45(5):651-60.
76. McCormick LM, Ziebell S, Nopoulos P, Cassell M, Andreasen NC, Brumm M. 2006. Anterior cingulate cortex: an MRI-based parcellation method. *Neuroimage*. 32(3):1167-75.
77. Micheva KD, Smith SJ. 2007. Array tomography: a new tool for imaging the molecular architecture and ultrastructure of neural circuits. *Neuron*. 55(1):25-36.
78. Mielke MM, Kozauer NA, Chan KC, George M, Toroney J, Zerrate M, Bandeen-Roche K, Wang MC, Vanzijl P, Pekar JJ, Mori S, Lyketsos CG, Albert M. 2009. Regionally-specific diffusion tensor imaging in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neuroimage*. 46(1):47-55.
79. Mohanty A, Engels AS, Herrington JD, Heller W, Ho MH, Banich MT, Webb AG, Warren SL, Miller GA. 2007. Differential engagement of anterior cingulate cortex subdivisions for cognitive and emotional function. *Psychophysiology*, 44(3):343-51.
80. Möller HJ, Laux G, Deister A. 2009. *Psychiatrie und Psychotherapie*. 4. Auflage. Stuttgart: Thieme Verlag.
81. Mori S, Barker PB. 1999. Diffusion magnetic resonance imaging: its principle and applications. *Anat Rec*. 257(3):102-9.
82. Mori S, van Zijl PC. 2002. Fiber tracking: principles and strategies - a technical review. *NMR Biomed*. 15(7-8):468-80.
83. Mori S, Zhang J. 2006. Principles of diffusion tensor imaging and its applications to basic neuroscience research. *Neuron*. 51(5):527-39.



84. Moseley ME, Cohen Y, Kucharczyk J, Mintorovitch J, Asgari HS, Wendland MF, Tsuruda J, Norman D. 1990. Diffusion-weighted MR imaging of anisotropic water diffusion in cat central nervous system. *Radiology*. 176 (2):439-45.
85. Nieuwenhuys R, Voogd J, van Huijzen C. 1988. *The Human Central Nervous System*. Berlin: Springer-Verlag.
86. Nuttin BJ, Gabriels L, van Kuyck K, Cosyns P. 2003. Electrical stimulation of the anterior limbs of the internal capsules in patients with severe obsessive-compulsive disorder: anecdotal reports. *Neurosurg Clin N Am*. 14(2):267-74.
87. Palm C, Axer M, Gräßel D, Dammers J, Lindemeyer J, Zilles K, Pietrzyk U, Amunts K. 2010. Towards Ultra-High Resolution Fibre Tract Mapping of the Human Brain - Registration of Polarised Light Images and Reorientation of Fibre Vectors. *Front Hum Neurosci*. 4:9.
88. Palomero-Gallagher N, Mohlberg H, Zilles K, Vogt B. 2008. Cytology and receptor architecture of human anterior cingulate cortex. *J Comp Neurol*. 508(6):906-26.
89. Palomero-Gallagher N, Vogt BA, Schleicher A, Mayberg HS, Zilles K. 2009. Receptor architecture of human cingulate cortex: evaluation of the four-region neurobiological model. *Hum Brain Mapp*, 30(8):2336-55.
90. Papez J. 1937. A proposed mechanism of emotion. *Arch Neurol Psychiatry*. 38:725-43
91. Park SK, Solomon D, Vartanian T. 2001. Growth factor control of CNS myelination. *Dev Neurosci*. 23(4-5):327-37.
92. Paus T, Otaky N, Caramanos Z, MacDonald D, Zijdenbos A, D'Avirro D, Gutmans D, Holmes C, Tomaiuolo F, Evans AC. 1996a. In vivo morphometry of the intrasulcal gray matter in the human cingulate, paracingulate, and superior-rostral sulci: hemispheric asymmetries, gender differences and probability maps. *J Comp Neurol*. 376(4):664-73.
93. Paus T, Tomaiuolo F, Otaky N, MacDonald D, Petrides M, Atlas J, Morris R, Evans AC. 1996b. Human cingulate and paracingulate sulci: pattern, variability, asymmetry, and probabilistic map. *Cereb Cortex*. 6(2):207-14.
94. Paus T. 2001. Primate anterior cingulate cortex: where motor control drive and cognition interface. *Nat Rev Neurosci*. 2(6):417-24.

95. Prosiegel M, Paulig M. 2002. Klinische Hirnanatomie. Funktion und Störung zentralnervöser Strukturen. München: Pflaum-Verlag GmbH & CoKG.
96. Rudrauf D, Mehta S, Grabowski TJ. 2008. Disconnection's renaissance takes shape: Formal incorporation in group-level lesion studies. *Cortex*. 44(8):1084-96.
97. Saur D, Schelter B, Schnell S, Kratochvil D, Küpper H, Kellmeyer P, Kümmerer D, Klöppel S, Glauche V, Lange R, Mader W, Feess D, Timmer J, Weiller C. 2010. Combining functional and anatomical connectivity reveals brain networks for auditory language comprehension. *Neuroimage*. 49(4):3187-97.
98. Scheuner G, Hutschenreiter J. 1972. Polarisationsmikroskopie in der Histophysik. Leipzig: Thieme Verlag.
99. Schmahmann JD, Pandya DN. 2008. Disconnection syndromes of basal ganglia, thalamus, and cerebrocerebellar systems. *Cortex*. 44(8):1037-66.
100. Schmahmann JD, Pandya DN. 2006. Fiber Pathways of the Brain. New York: Oxford University Press.
101. Schmahmann JD, Pandya DN, Wang R, Dai G, D'Arceuil HE, de Crespigny AJ, Wedeen VJ. 2007. Association fibre pathways of the brain: parallel observations from diffusion spectrum imaging and audioradiography. *Brain*. 130(Pt3):630-53.
102. Schmidt RF (Hrsg.). 1979. Grundriß der Neurophysiologie. Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag.
103. Segal D, Schmitz C, Hof PR. 2009. Spatial distribution and density of oligodendrocytes in the cingulum bundle are unaltered in schizophrenia. *Acta Neuropathol*. 117(4):385-94.
104. Simms ML, Kemper TL, Timbie CM, Bauman ML, Blatt GJ. 2009. The anterior cingulate cortex in autism: heterogeneity of qualitative and quantitative cytoarchitectonic features suggests possible subgroups. *Acta Neuropathol*. 118(5):673-84.
105. Sporns O. 2011. The human connectome: a complex network. *Ann N Y Acad Sci*. 1224:109-25.
106. Sporns O, Tononi G, Edelman GM. 2000. Theoretical neuroanatomy: relating anatomical and functional connectivity in graphs and cortical connection matrices. *Cereb. Cortex* 10(2):127-41.

107. Sporns O, Tononi G, Kötter R. 2005. The human connectome: A structural description of the human brain. *PLoS Comput Biol.* 1(4):e42.
108. Stark AK, Uylings HB, Sanz-Arigita E, Pakkenberg B. 2004. Glial cell loss in the anterior cingulate cortex, a subregion of the prefrontal cortex, in subjects with schizophrenia. *Am J Psychiatry.* 161(5):882-8.
109. Steele JD, Christmas D, Eljamel MS, Matthews K. 2008. Anterior cingulotomy for major depression: clinical outcome and relationship to lesion characteristics. *Biol Psychiatry.* 63(7):670-7.
110. Sun Z, Wang F, Cui L, Breeze J, Du X, Wang X, Cong Z, Zhang H, Li B, Hong N, Zhang D. 2003. Abnormal anterior Cingulum in patients with schizophrenia: a diffusion tensor imaging study. *Neuroreport.* 14(14):1833-6.
111. Takahashi E, Dai G, Wang R, Ohki K, Rosen GD, Galaburda AM, Grant PE, Wedeen VJ. 2010. Development of cerebral fiber pathways in cats revealed by diffusion spectrum imaging. *Neuroimage.* 49(2):1231-40.
112. Tow PM, Whitty CW. 1953. Personality changes after operations on the cingulate gyrus in man. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 16(3):186-93.
113. Trepel M. 2008. *Neuroanatomie: Struktur und Funktion.* Auflage: 4. Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH.
114. Tuch DS, Reese TG, Wiegell MR, Wedeen VJ. 2003. Diffusion MRI of complex neural architecture. *Neuron.* 40(5):885-95.
115. Turaga SC, Murray JF, Jain V, Roth F, Helmstaedter M, Briggman K, Denk W, Seung HS. 2010. Convolutional networks can learn to generate affinity graphs for image segmentation. *Neural Comput.* 22(2):511-38.
116. Vogt BA. 2005. Pain and emotion interactions in subregions of the cingulate gyrus. *Nat Rev Neurosci.* 6(7):533-44.
117. Vogt BA, Berger GR, Derbyshire SW. 2003. Structural and functional dichotomy of human midcingulate cortex. *Eur J Neurosci.* 18(11):3134-44.
118. Vogt BA, Finch DM, Olson CR. 1992. Functional heterogeneity in cingulate cortex: the anterior executive and posterior evaluative regions. *Cereb Cortex.* 2(6):435-43.
119. Vogt BA, Nimchinsky EA, Vogt LJ, Hof PR. 1995. Human cingulate cortex: surface features, flat maps, and cytoarchitecture. *J Comp Neurol.* 359(3):490-506.

120. Vogt BA, Vogt L, Laureys S. 2006. Cytology and functionally correlated circuits of human posterior cingulate areas. *Neuroimage*. 29(2):452-66
121. Wakana S, Caprihan A, Panzenboeck MM, Fallon JH, Perry M, Gollub RL, Hua K, Zhang J, Jiang H, Dubey P, Blitz A, van Zijl P, Mori S. 2007. Reproducibility of quantitative tractography methods applied to cerebral white matter. *Neuroimage*. 36(3):630-44.
122. Wang F, Jackowski M, Kalmar JH, Chepenik LG, Tie K, Qiu M, Gong G, Pittman BP, Jones MM, Shah MP, Spencer L, Papademetris X, Constable RT, Blumberg HP. 2008. Abnormal anterior cingulum integrity in bipolar disorder determined through diffusion tensor imaging. *Br J Psychiatry*. 193(2):126-9.
123. Wang F, Jiang T, Sun Z, Teng SL, Luo X, Zhu Z, Zang Y, Zhang H, Yue W, Qu M, Lu T, Hong N, Huang H, Blumberg HP, Zhang D. 2009. Neuregulin 1 genetic variation and anterior cingulum integrity in patients with schizophrenia and healthy controls. *J Psychiatry Neurosci*. 34(3):181-6.
124. Wang F, Sun Z, Cui L, Du X, Wang X, Zhang H, Cong Z, Hong N, Zhang D. 2004. Anterior cingulum abnormalities in male patients with schizophrenia determined through diffusion tensor imaging. *Am J Psychiatry*. 161(3):573-5.
125. Wang L, Hosakere M, Trein JC, Miller A, Ratnanather JT, Barch DM, Thompson PA, Qiu A, Gado MH, Miller MI, Csernansky JG. 2007. Abnormalities of cingulate gyrus neuroanatomy in schizophrenia. *Schizophr Res*. 93(1-3):66-78.
126. Wedeen VJ, Hagmann P, Tseng WY, Reese TG, Weisskoff RM. 2005. Mapping complex tissue architecture with diffusion spectrum magnetic resonance imaging. *Magn Reson Med*. 54(6):1377-86.
127. Wedeen VJ, Wang RP, Schmahmann JD, Benner T, Tseng WY, Dai G, Pandya DN, Hagmann P, D'Arceuil H, de Crespigny AJ. 2008. Diffusion spectrum magnetic resonance imaging (DSI) tractography of crossing fibers. *Neuroimage*. 41(4):1267-77.
128. Wernicke C. 1874. Der aphasische Symptomencomplex: eine psychologische Studie auf anatomischer Basis. Breslau: M. Cohn & Weigert.
129. Whitty CW, Duffield JE, Tov PM, Cairns H. 1952. Anterior cingulectomy in the treatment of mental disease. *Lancet*. 1(6706):475-81.

130. Wood SJ, Yücel M, Wellard RM, Harrison BJ, Clarke K, Fornito A, Velakoulis D, Pantelis C. 2007. Evidence for neuronal dysfunction in the anterior cingulate of patients with schizophrenia: a proton magnetic resonance spectroscopy study at 3 T. *Schizophr Res.* 94(1-3):328-31.
131. Wright IC, Rabe-Hesketh S, Woodruff PW, David AS, Murray RM, Bullmore ET. 2000. Meta-analysis of regional brain volumes in schizophrenia. *Am J Psychiatry.* 157(1):16-25.
132. Xie S, Xiao JX, Wang YH, Wu HK, Gong GL, Jiang XX. 2005. Evaluation of bilateral cingulum with tractography in patients with Alzheimer's disease. *Neuroreport.* 16(12):1275-8.
133. Young MP. 1993. The organization of neural systems in the primate cerebral cortex. *Proc Biol Sci.* 252(1333):13-8.
134. Yücel M, Stuart GW, Maruff P, Velakoulis D, Crowe SF, Savage G, Pantelis C. 2001. Hemispheric and gender-related differences in the gross morphology of the anterior cingulate/paracingulate cortex in normal volunteers: an MRI morphometric study. *Cereb Cortex.* 11(1):17-25.
135. Yücel M, Wood SJ, Phillips LJ, Stuart GW, Smith DJ, Yung A, Velakoulis D, McGorry PD, Pantelis C. 2003. Morphology of the anterior cingulate cortex in young men at ultra-high risk of developing a psychotic illness. *Br J Psychiatry.* 182:518-24.
136. Zetsche T, Preuss U, Frodl T, Watz D, Schmitt G, Koutsouleris N, Born C, Reiser M, Möller HJ, Meisenzahl EM. 2007. In-vivo topography of structural alterations of the anterior cingulate in patients with schizophrenia: new findings and comparison with the literature. *Schizophr Res.* 96(1-3):34-45.
137. Zhang Y, Schuff N, Jahng GH, Bayne W, Mori S, Schad L, Mueller S, Du AT, Kramer JH, Yaffe K, Chui H, Jagust WJ, Miller BL, Weiner MW. 2007. Diffusion tensor imaging of cingulum fibers in mild cognitive impairment and Alzheimer disease. *Neurology.* 68(1):13-9.

## 9 Anhang

### 9.1 Lebenslauf

#### Persönliche Daten

Name	Friederike Elisabeth Gecks, geb. Schuchardt
Geburtsdatum	30.10.1985
Geburtsort	Weimar
Familienstand	verheiratet
Anschrift	Prellerstraße 1, 99423 Weimar

#### Schul Ausbildung

08/1996 - 06/2004 Lyonel-Feiningergymnasium Mellingen  
Abschluss: Abitur, Gesamtnote sehr gut (1,1)

#### Hochschulausbildung

10/2004 - 10/2010 Studium der Humanmedizin, Friedrich-Schiller-Universität Jena  
Abschluss: Staatsexamen, Gesamtnote gut

09/2006 1. Ärztliche Prüfung

10/2010 2. Ärztliche Prüfung

11/2010 Approbation als Ärztin

#### Berufliche Tätigkeit

Seit 04/2011 Assistenzärztin der Klinik für Innere Medizin/ Pneumologie  
Prof. Dr. med. R. Bonnet, Zentralklinik Bad Berka GmbH

#### Publikation

11/2011 Axer H, Beck S, Axer M, Schuchardt F, Heepe J, Flücken A, Axer M, Prescher A, Witte OW. 2011. Microstructural analysis of human white matter architecture using polarized light imaging: views from neuroanatomy. Front Neuroinform. 5:28.

## 9.2 Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. med. O. W. Witte, dem Direktor der Hans Berger Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Jena, für die Möglichkeit, meine Dissertation an seinem Institut zu erstellen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. H. Axer, meinem Doktorvater, für die Überlassung des Themas, für seine ausgezeichnete und geduldige Betreuung sowie die engagierte Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Weiterer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. A. Prescher, Institut für Anatomie der RWTH Aachen für die Bereitstellung der Gehirne, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ich danke außerdem Sindy Beck und Claudia Sommer für die freundliche Zusammenarbeit und die technische Unterstützung bei der Erstellung der Hirnschnittpräparate.

Ebenso danke ich für die Unterstützung und die Bereitstellung der Mittel im Rahmen des BMBF-Verbundprojektes („Die Rolle des fronto-cingulären Systems bei Fehlerverarbeitung und Konfliktlösung: Implikationen für Schizophrenie und Zwangsstörung.“ Teilprojekt 5: Mikrostrukturelle Analyse der Faseranatomie des Cingulums. DLR, Bonn, 01GW0740).

Abschließend danke ich meinem geliebten Ehemann für die unermüdliche Unterstützung bei der Erstellung meiner Dissertation sowie meinen Eltern, die mir das Medizinstudium ermöglicht und mich während dieser Zeit tatkräftig unterstützt haben.

### 9.3 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Friederike Gecks, geb. 30.10.1985, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und der Auswertung des Materials sowie der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. med. H. Axer,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Weimar

Friederike Gecks